



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

| | |
|---|----------------------------|
| In re Application of: KIKUCHI ET AL. | |
| | Art Unit: 1632 |
| Application No.: 10/673,860 | Examiner: [to be assigned] |
| Filing Date: September 30, 2003 | Atty. Docket: US-111 |
| Title: METHODS FOR SECRETORY PRODUCTION OF PROTEINS | |

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119 IN UTILITY APPLICATION

Commissioner of Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Priority under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed to the following priority document(s), filed in a foreign country within one (1) year prior to the filing of the above-referenced United States utility patent application (35 U.S.C. § 172):

| Country | Priority Document Appl. No. | Filing Date |
|---------|-----------------------------|----------------|
| Japan | 2001-98808 | March 30, 2001 |

A certified copy of each listed priority document is submitted herewith. Prompt acknowledgment of this claim and submission is respectfully requested.

Respectfully submitted,


Shelly Guest Cermak
Reg. No. 39,571

Date: January 8, 2004

PTO Customer Number: 000038108
Ajinomoto U.S.A., Inc.
1120 Connecticut Avenue, Ste. 1010
Washington, D.C. 20036
202.457.0284

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application: 2001年 3月30日

出願番号

Application Number: 特願2001-098808

[ST.10/C]:

[JP2001-098808]

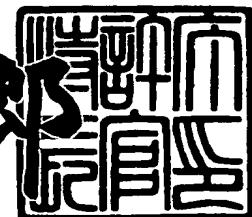
出願人

Applicant(s): 味の素株式会社

2003年 4月 4日

特許長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一



出証番号 出証特2003-3023815

【書類名】 特許願
【整理番号】 Y1I0204
【提出日】 平成13年 3月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 菊池 慶実
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 伊達 雅代
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 梅澤 有希子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 横山 敬一
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 平馬 晴雄
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
発酵技術研究所内
【氏名】 松井 裕

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100059959

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 稔

【選任した代理人】

【識別番号】 100067013

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 文昭

【選任した代理人】

【識別番号】 100082005

【弁理士】

【氏名又は名称】 熊倉 槟男

【選任した代理人】

【識別番号】 100065189

【弁理士】

【氏名又は名称】 宮戸 嘉一

【選任した代理人】

【識別番号】 100096194

【弁理士】

【氏名又は名称】 竹内 英人

【選任した代理人】

【識別番号】 100074228

【弁理士】

【氏名又は名称】 今城 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100084009

【弁理士】

【氏名又は名称】 小川 信夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100082821

【弁理士】

【氏名又は名称】 村社 厚夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100086771

【弁理士】

【氏名又は名称】 西島 孝喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100084663

【弁理士】

【氏名又は名称】 箱田 篤

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008604

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質の分泌生産法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌中で機能するプロモーター配列の下流にコリネ型細菌由来のシグナルペプチド領域をコードする核酸配列が接続され、更に前記シグナルペプチド領域をコードする核酸配列の下流に異種タンパク質をコードする核酸配列が接続された発現遺伝子構築物を有し、かつ、同じ発現遺伝子構築物を有する野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869と比べて少なくとも2倍の該異種タンパク質を分泌する能力を有するコリネ型細菌変異株を培養し、生成した異種タンパク質を回収することを特徴とする、異種タンパク質の製造方法。

【請求項2】 コリネ型細菌変異株がコリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036(FERM BP-734)又はその変異株である請求項1記載の方法。

【請求項3】 コリネ型細菌変異株がコリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036(FERM BP-734)より誘導された細胞表層タンパク質を生産しない変異株である請求項1記載の方法。

【請求項4】 シグナルペプチドがコリネ型細菌由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 シグナルペプチドがコリネバクテリウム・グルタミカム由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 シグナルペプチドが配列番号1または2に示すアミノ酸配列を有する請求項5記載の方法。

【請求項7】 シグナルペプチドがコリネバクテリウム・アンモニアゲネス由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 シグナルペプチドが配列番号3に示すアミノ酸配列を有する請求項7記載の方法。

【請求項9】 シグナルペプチドが、配列番号1～3に記載のアミノ酸配列

において少なくとも一つのアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入またはこれらの組み合わせを含む請求項5または7記載の方法。

【請求項10】 コリネ型細菌由来変異株の培養がカルシウムイオンを0.25g/1(2.25mM)以上含有する培地で行われる請求項1～9のいずれかに記載の方法

【請求項11】 コリネ型細菌由来変異株の培養が溶存酸素濃度を3%以下に制御しつつ行われる請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、異種タンパク質をコリネ型細菌で効率よく分泌生産する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

異種タンパク質の分泌生産としてはこれまでにバチルス属細菌による分泌生産の総説 [Microbiol. rev., 57, 109-137(1993)]、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* による分泌生産の総説 [Biotechnol., 11, 905-910(1993)]、そして *Aspergillus* 属のカビによる工業的生産の報告 [Biotechnol., 6, 1419-1422(1988); Biotechnol., 9, 976-981(1991)] 等のように多数報告されている。

本発明の1つの実施態様において分泌生産されるトランスグルタミナーゼはタンパク質のペプチド鎖内にある γ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。本酵素をタンパク質に作用させると、 ϵ -(γ -Glu)-Lys 架橋形成反応、 Gln の脱アミド化による Glu への置換反応が起こりうる。このトランスグルタミナーゼは、ゼリー等のゲル化食品、ヨーグルト、チーズ、あるいはゲル状化粧品などの製造や食肉の肉質改善等に利用されている（特公平1-50382）。また、熱に安定なマイクロカプセルの素材、固定化酵素の担体などの製造に利用されているなど、産業上利用性の高い酵素である。

【0003】

トランスグルタミナーゼはこれまでに動物由来のものと微生物由来のもの（マ

イクロバイアルトランスグルタミナーゼ：以下「MTG」という）が知られている。前者は、カルシウムイオン依存性の酵素で、動物の臓器、皮膚、血液などに分布している。例えば、モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ（K. Ikura et al. *Biochemistry* 27, 2898(1988)）、ヒト表皮ケラチン細胞トランスグルタミナーゼ（M. A. Phillips et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9333(1990)）、ヒト血液凝固因子XIII（A. Ichinose et al. *Biochemistry* 25, 6900(1990)）などがある。

【0004】

後者については、ストレプトバーチシリウム属 (*Streptoverticillium*) の菌から、カルシウム非依存性のものが発見されている。例えば、ストレプトバーチシリウム・グリセオカルニウム (*Streptoverticillium griseocarneum*) IFO 12776、ストレプトバーチシリウム・シナモニウム (*Streptoverticillium cinnamoneum* sub sp. *cinnamoneum*)（以後 *S. cinnamoneum* と略すことがある）IFO 12852、ストレプトバーチシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium moharaense*)（以後、*S. moharaense* と略すことがある）IFO 13819 等があげられている（特開昭64-27471）。これらの微生物が生産するトランスグルタミナーゼの一次構造はペプチドマッピング及び遺伝子構造解析の結果、動物由来のものとは相同意を全く持たないことが判明している（ヨーロッパ特許公開公報0 481 504 A1）。

【0005】

微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）は、上記菌類等の培養物から精製操作をへて製造されているため、供給量、効率等の点で問題があった。また、遺伝子工学的手法によるトランスグルタミナーゼの製造も試みられている。トランスグルタミナーゼタンパク質およびその遺伝子については例えば、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 82-87(1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 88-92(1994)、*Biochimie*, 80, 313-319(1998)、*Eur. J. Biochem.*, 257, 570-576(1998), WO 96/06931, WO 96/22366などに報告されており、これらには例えば *Streptomyces lividans*、*Aspergillus oryzae*、*Escherichia coli* 等の宿主ベクター系での発現生産に関する報告がなされている。これらの情報と共に、*E. coli*、酵

母等の微生物における分泌発現（特開平5-199883）による方法とE.coliでMTGを不活性融合タンパク質封入体として発現させた後、この封入体をタンパク質変性剤で可溶化し、脱変性剤処理を経て再生させることにより活性をもつMTGを生産する方法（特開平6-30771）が報告されている。しかしながら、E.coliや酵母等の微生物によるこのような分泌発現においては、その発現量が非常に少ないという問題点が指摘される。

【0006】

一方、コリネ型細菌を利用して異種タンパク質を効率良く分泌生産するための研究としては、これまでにコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)（以後、*C. glutamicum*と略すことがある）によるヌクレアーゼ（nuclease）やリパーゼの分泌 [US4965197, *J.Bacteriol.*, 174, 1854-1861(1992)] 及び、サチライシン等のプロテアーゼの分泌 [Appl. *Environ. Microbiol.*, 61, 1610-1613(1995)]、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質の分泌に関する研究 [特表平6-502548]、これを利用したフィブロネクチン結合タンパク質の分泌 [Appl. *Environ. Microbiol.*, 63, 4392-4400(1997)]、変異型分泌装置を利用してタンパク質の分泌を向上させた報告 [特開平11-169182] 等があるが、ごく限られたタンパク質について極めて少数の報告があるのみである。タンパク質の蓄積量でみると、Appl. *Environ. Microbiol.*, 61, 1610-1613 (1995)において、*Bacillus subtilis*由来のサチライシン遺伝子(aprE)のプロモーター、リボソーム結合部位及びシグナルペプチドの配列を利用して*Dichelobacter nodosus*由来のアルカリ性プロテアーゼの遺伝子を*C. glutamicum*において発現させ、約2.5mg/mlの蓄積を認めた例はあるものの、US4965197、特表平6-502548、あるいは特開平11-169182の記載においては具体的な分泌蓄積の値が記載されておらず、また、フィブロネクチン結合タンパク質の分泌 [Appl. *Environ. Microbiol.*, 63, 4392-4400(1997)]においては、最大約2.5μg/Lという非常に少量の分泌蓄積が確認されているに過ぎない。この様に、実用的なレベルで効率よく培地中に異種タンパク質を蓄積させたという報告は未だなされていない。

【0007】

また、コリネ型細菌の遺伝子操作技術は、プロトプラストによるトランスフォーメーション法の確立 [J.Bacteriol., 159, 306-311(1984); J.Bacteriol., 161, 463-467(1985)]、各種ベクターの開発 [Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903(1984); J.Bacteriol., 159, 306-311(1984); J.Gen. Microbiol., 130, 2237-2246(1984); Gene, 47, 301-306(1986); Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 65-69(1989)]、遺伝子発現制御法の開発 [Bio/Technology, 6, 428-430(1988)] 及びコスミドの開発 [Gene, 39, 281-286(1985)] など、プラスミドやファージを用いた系で発展してきた。またコリネ型細菌由来の遺伝子クローニング [Nucleic Acids Res., 14, 10113-1011(1986); J. Bacteriol., 167, 695-702(1986); Nucleic Acids Res., 15, 10598(1987); Nucleic Acids Res., 15, 3922(1987); Nucleic Acids Res., 16, 9859(1988); Agric. Biol. Chem., 52, 525-531 (1988); Mol. Microbiol., 2, 63-72(1988); Mol. Gen. Genet., 218, 330-339(1989); Gene, 77, 237-251(1989)] についても報告されている。

【0008】

さらにコリネ型細菌由来の転移因子についても報告されている [W093/18151; EP0445385; 特開平6-46867; Mol. Microbiol., 11, 739-746(1994); Mol. Microbiol., 14, 571-581(1994); Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); FEMS Microbiol. Lett., 126, 1-6(1995); 特開平7-107976]。

転移因子とは染色体上で転移し得るDNA断片で、原核生物から真核生物までの広い範囲の生物に存在する事が知られている。転移因子を利用したトランスポゾンが開発され [W093/18151; 特開平7-107976; Mol. Gen. Genet., 245, 397-405(1994); 特開平9-70291]、トランスポゾンで異種遺伝子を発現させることも可能になってきた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、コリネ型細菌に産業上有用な異種タンパク質、例えばトランスグルタミナーゼを生産させ、これを効率的に菌体外に分泌（分泌生産）させることによって、異種タンパク質を製造する方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、コリネ型細菌を用いて異種タンパク質を生産するに際し、野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869と比べて顕著に高い生産能を示す変異株を見いだし、産業上有用な異種タンパク質を効率よく分泌生産する方法を発明するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869と比べて少なくとも2倍の異種タンパク質を分泌する能力を有するコリネ型細菌変異株に、コリネ型細菌由来のシグナルペプチドの下流に異種タンパク質が接続された融合タンパク質を産生させ、該異種タンパク質を菌体外に分泌させることを特徴とする、異種タンパク質の製造方法である。

より具体的には、本発明は、コリネ型細菌由来のシグナルペプチド領域、特に細胞表層タンパク質のシグナルペプチド領域をコードする配列の下流に目的タンパク質遺伝子配列を結合した発現構築物をコリネ型細菌に導入し、得られた形質転換コリネ型細菌を培養し、生じたタンパク質を菌体外に効率よく分泌させ、菌体外に放出されたタンパク質を回収することによって、多量の目的異種タンパク質、例えばトランスグルタミナーゼを得る方法である。

【0012】

なお、本明細書において、タンパク質またはペプチドが「分泌」されるとは、タンパク質またはペプチドの分子が細菌菌体外（細胞外）に移送されることをいい、最終的にそのタンパク質またはペプチド分子が培地中に完全に遊離状態におかれる場合はもちろん、一部のみが菌体外に存在している場合、菌体表層に存在している場合も含む。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の方法により、コリネ型細菌が宿主ベクター系として用いられ、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドの下流に目的タンパク質遺伝子を結合した発現構築物が作製され、これがコリネ型細菌内に導入され、発現され、菌体外に分泌された多量の目的タンパク質が得られる。本発明の方法で分泌生

産される異種タンパク質は産業上有用な酵素や生理活性タンパク質、ペプチド等であり、本発明の実施態様の一つにおいて分泌生産されるトランスグルタミナーゼは食品加工や医薬等に幅広く利用されている。

【0014】

分泌型タンパク質は一般にはプレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳され、その後、成熟型タンパク質になることが知られている。すなわち、一般に、プレペプチドまたはプレプロペプチドとして翻訳された後、シグナルペプチド（「プレ部分」）が切断されて成熟ペプチドまたはプロペプチドに変換され、プロペプチドはプロテアーゼによってさらにプロ部分が切断されて成熟ペプチドになることが知られている。本明細書において、「シグナル配列」とは、分泌性タンパク質前駆体のN末端に存在し、かつ天然の成熟タンパク質には存在しない配列をいい、「シグナルペプチド」とはそのようなタンパク質前駆体から切り取られるペプチドをいう。一般にはシグナル配列は菌体外への分泌に伴ってプロテアーゼ（一般にシグナルペプチダーゼと呼ばれる）によって切断される。このようなシグナルペプチドは生物種を越えて一定の共通した配列上の特徴を有するが、ある生物種で分泌機能を示すシグナルペプチドが他の生物種においても必ずしも分泌機能を発揮するということではない。

【0015】

本明細書において、シグナルペプチドおよびプロ部分の両方を有するタンパク質、すなわち、一次翻訳産物を「プレプロタンパク質」と称することがあり、また、シグナルペプチドを有しないがプロ部分を有するタンパク質を「プロタンパク質」と称することがある。プロタンパク質のプロ部分は「プロ構造部」または単に「プロ構造」と称することもあり、本明細書においてタンパク質の「プロ構造部／プロ構造」とタンパク質の「プロ部分」とは互換的に使用される。プレプロタンパク質またはプレタンパク質において、そのシグナルペプチドは異なるタンパク質に由来する場合であっても、目的タンパク質に天然に存在するシグナルペプチドであってもよいが、使用する宿主の分泌型タンパク質に由来することが好ましい。あるいは、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変してもよい。

【0016】

さらに本発明の目的に使用し得るシグナルペプチドは、それが由来する天然の成熟タンパク質のN末端アミノ酸配列を一部含んでいてもよい。シグナルペプチドが異なるタンパク質に由来する場合はプレプロタンパク質を特に「異種融合プレプロタンパク質」と称することもある。例えば、タンパク質がトランスグルタミナーゼの場合は、それぞれ「プレプロトランスグルタミナーゼ」、「プロトランスグルタミナーゼ」および「異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ」と称される。また、「プロ部分を切断した」タンパク質とは、ペプチド結合を切断することによってプロ部分を構成する少なくとも1以上のアミノ酸を除去したタンパク質をいい、そのN末端領域が天然の成熟型タンパク質のものと完全に一致するタンパク質、および、そのタンパク質の活性を有する限り、天然のタンパク質に比較してN末端にプロ部分に由来する1以上の余分のアミノ酸を有するものおよび天然の成熟型タンパク質よりもアミノ酸配列が短いタンパク質も含まれる。

【0017】

これまでコリネ型細菌を用いて異種タンパク質を菌体外に分泌生産した例は従来の技術の項に述べた如く極めて少なく、かつ技術としては未完である。さらにまたコリネ型細菌が自身で菌体外にプロテアーゼ等のタンパク質を分泌しているという例は知られておらず、内在性DNaseの分泌[US4965197]と、本発明において使用する細胞表層タンパク質[特表平6-502548]が細胞表層より剥がれ落ちて菌体外に見出されている事実が知られている例である。ただし、コリネ型細菌では分泌に関わるシグナルペプチドは細胞表層タンパク質を除いてはこれまで知られていない。これまでに知られているコリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、コリネバクテリウム・グルタミカム(*C. glutamicum*)の細胞表層タンパク質であるPS1及びPS2の遺伝子[特表平6-502548]、及びコリネバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes*) (以後、*C. ammoniagenes*と略すことがある)の細胞表層タンパク質であるSlpAの遺伝子[特開平10-108675]が知られているだけである。これらのタンパク質の内、PS1とSlpAの間には若干の相同性(約30%)が認められるが、その他にはほとんど相同性は認められず、さらにシグナル配列領域に関しては互いに相同性は認められて

いない。シグナル配列の例として、コリネバクテリウム・グルタミカムのPS1とPS2のシグナル配列を配列番号1と2に、コリネバクテリウム・アンモニアゲネスのS1pAのシグナル配列を配列番号3に示す。

【0018】

そこで、本発明者らはコリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*) (旧名称ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)) ATCC13869株よりPS2タンパク質遺伝子をクローン化し、その配列を決定したところ、シグナル配列領域には既知の*C. glutamicum*由来の配列(特表平6-502548)との違いが認められなかったが、成熟型細胞表層タンパク質のN末端アミノ酸の38残基までに2つの違いが認められた(既知の配列では、配列番号5に示すアミノ酸配列において40残基目のAsnがThr、55残基目のGluがGlyとなっている)。そのシグナル配列30アミノ酸残基および成熟型細胞表層タンパク質のN末端アミノ酸38残基を含む68残基をコードする塩基配列及びプロモーター領域を含むその5'-上流領域を配列番号4に、アミノ酸配列を配列番号5に示した。

【0019】

次に、本発明者はコリネ型細菌において異種タンパク質を多量に菌体外に分泌生産することが可能かどうかを試みるべく細胞表層タンパク質のプロモーター領域やシグナルペプチドを含む領域を利用しての異種タンパク質の分泌研究を行った。

放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子はGCコンテントが高いが、コリネ型細菌もそれに近く、またコドン利用性も近似しているので、放線菌の遺伝子そのものがそのまま利用しうる利点がある。そこで本発明者は放線菌由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子をそのまま利用しうるか否かを検討した結果、放線菌由来のトランスグルタミナーゼのシグナルペプチドはコリネ型細菌では機能しないことがあきらかになった。しかしながらコリネ型細菌由来の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドと融合した放線菌由来のプロ構造部を含む成熟タンパク質をコードするトランスグルタミナーゼ遺伝子はそのまま有効に機能し、プロ構造部を有するプロタンパク質として効率良く菌体外に分泌されることが明らかとな

った。さらにまた細胞表層タンパク質のシグナルペプチド30アミノ酸残基と成熟細胞表層タンパク質のN末端部分の38アミノ酸残基を余分に含む、すなわち、成熟細胞表層タンパク質のN末端部分が融合したプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子を使用するとプロトランスグルタミナーゼの菌体外分泌効率がさらに増大することが示された。

【0020】

本発明に言うコリネ型細菌とは好気性のグラム陽性かん菌であり、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1991))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌を含む。コリネ型細菌を使用することの利点としてはこれまでに異種タンパク質の分泌に好適とされるカビ、酵母やBacillus属細菌と比べ、もともと菌体外に分泌されるタンパク質が極めて少なく、異種タンパク質を分泌生産した場合の精製過程が簡略化、省略化できることであり、また糖、アンモニアや無機塩等のシンプルな培地で良く生育し、培地代や培養方法、培養生産性で優れていることである。

【0021】

本発明において宿主菌として使用できるコリネ型細菌としては、L-グルタミン酸生産菌に代表されるブレビバクテリウム・サッカロリティクムATCC14066、ブレビバクテリウム・インマリオフィルムATCC14068、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム(コリネバクテリウム・グルタミカム)ATCC13869、ブレビバクテリウム・ロゼウムATCC13825、ブレビバクテリウム・フラバム(コリネバクテリウム・グルタミカム)ATCC14067、コリネバクテリウム・アセトアシドフィルムATCC13870、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032、コリネバクテリウム・リリウム(コリネバクテリウム・グルタミカム)ATCC15990、ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス(コリネバクテリウム・アンモニアゲネス)ATCC6871等の野生株またはその変異株より誘導される変異株であって、野生型コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869と比べて少なくとも2倍の異種タンパク質を分泌する能力を有する変異株である。

【0022】

本発明の変異株としては、例えばグルタミン酸生産性を失った変異株、更にはリジン等のアミノ酸生産変異株、イノシン等の核酸のような他の物質を生産する変異株も含まれる。本発明の変異株は、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロソグアニジン等の化学変異剤による処理を行なった後、タンパク質の分泌生産能が高まった株を選抜することにより得ることができる。

とりわけ、野生株コリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum*) ATCC13869よりストレプトマイシン(Sm)耐性変異株として分離したコリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036(FERM BP-734)はその親株(野生株)に比べ、タンパク質の分泌に関わる機能遺伝子に変異が存在することが予測され、異種タンパク質の分泌生産能が至適培養条件下での蓄積量としておよそ2~3倍と極めて高く、宿主菌として好適である。さらに、このような菌株から細胞表層タンパク質を生産しないように改変した菌株を宿主として使用すれば、培地中に分泌された異種タンパク質の精製が容易となり、特に好ましい。そのような改変は、突然変異または遺伝子組換え法により染色体上の細胞表層タンパク質またはその発現調節領域に変異を導入することにより行うことができる。

【0023】

本発明に使用される遺伝子構築物は、一般にプロモーター、適切なシグナルペプチドをコードする配列および目的タンパク質をコードする核酸断片、およびコリネ型細菌中で目的タンパク質遺伝子を発現させるために必要な制御配列(オペレーターやターミネーター等)を、それらが機能し得るように適切な位置に有するものである。目的タンパク質は、N末端にプロ構造部を有していてもよい。この構築物のために使用できるベクターは特に制限されず、コリネ型細菌中で機能し得るものであればよく、プラスミドのように染色体外で自律増殖するものであっても細菌染色体に組み込まれるものであってもよい。コリネ型細菌由来のプラスミドは特に好ましい。これらには、例えばpHM1519(*Agric. Biol. Chem.*, 48, 2901-2903(1984))、pAM330 (*Agric. Biol. Chem.*, 48, 2901-2903(1984))、およびこれらを改良した薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドが含まれる。

【0024】

また、人工トランスポゾン等も利用することができる。トランスポゾンが使用

される場合は相同組換えまたはそれ自身の転移能によって目的遺伝子が染色体中に導入される。

本発明に使用できるプロモーターは特に限定されず、コリネ型細菌の菌体内で機能し得るプロモーターであれば一般に使用でき、更に異種由来の、例えばtacプロモーター等のE.coli由来のプロモーターであってもよい。その中で、tacプロモーター等の強力なプロモーターがより好ましい。

【0025】

コリネ型細菌由来のプロモーターとしては、例えば、細胞表層タンパク質のPS1、PS2、SlpAの遺伝子のプロモーター、各種アミノ酸生合成系、例えばグルタミン酸生合成系のグルタミン酸脱水素酵素遺伝子、グルタミン合成系のグルタミン合成酵素遺伝子、リジン生合成系のアスパルトキナーゼ遺伝子、スレオニン生合成系のホモセリン脱水素酵素遺伝子、イソロイシンおよびバリン生合成系のアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子、ロイシン生合成系の2-イソプロピルリンゴ酸合成酵素遺伝子、プロリンおよびアルギニン生合成系のグルタミン酸キナーゼ遺伝子、ヒスチジン生合成系のホスホリボシル-ATPピロホスホリラーゼ遺伝子、トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニン等の芳香族アミノ酸生合成系のデオキシアラビノヘプツロン酸リン酸(DAHP)合成酵素遺伝子、イノシン酸およびグアニル酸のような核酸生合成系におけるホスホリボシルピロホスフェート(PRPP)アミドトランスフェラーゼ遺伝子、イノシン酸脱水素酵素遺伝子およびグアニル酸合成酵素遺伝子のプロモーターが挙げられる。

【0026】

本発明で使用するシグナルペプチドは、宿主であるコリネ型細菌の分泌性タンパク質のシグナルペプチドであり、好ましくは、コリネ型細菌の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドである。コリネ型細菌の細胞表層タンパク質としては、C. glutamicumに由来するPS1及びPS2(特表平6-502548)、及びC. ammoniagenesに由来するSlpA(特開平10-108675)が挙げられる。PS1のシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号1に、PS2のシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に、SlpAのシグナルペプチドのアミノ酸配列を配列番号3に示す。また、米国特許4965197によれば、コリネ型細菌由来のDNaseにもシグナ

ルペプチドがあると言わされており、そのようなシグナルペプチドも本発明に利用することができる。

シグナルペプチドには、それが由来する分泌性タンパク質のN末端アミノ酸配列の一部が付加されていてもよい。シグナル配列は、翻訳産物が菌体外に分泌される際にシグナルペプチダーゼによって切断される。なお、シグナルペプチドをコードする遺伝子は、天然型のままでも使用できるが、使用する宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンを有するように改変してもよい。

【0027】

これらのシグナルペプチドを使用する場合、目的とするタンパク質をコードする遺伝子は、シグナルペプチドをコードする遺伝子の3'-末端側に接続し、かつ、上記プロモーターにより発現の制御を受けるように配置する。

本発明によって分泌生産し得る有用タンパク質は、本質的には動植物や微生物由来の分泌型タンパク質全般が含まれ、特に限定されない。例えば、プロテアーゼ、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、コラゲナーゼおよびキチナーゼ等のタンパク質を本発明によって分泌生産することができる。本発明によって分泌生産されるタンパク質は天然で分泌型であるタンパク質が好ましく、プロ構造部が付加したタンパク質でもよく、トランスグルタミナーゼは本発明によって分泌生産される有用タンパク質として特に好ましい。トランスグルタミナーゼ遺伝子としては放線菌、例えば *S. m* *obaraense* IF0 13819、*S. cinnamoneum* IF0 12852、*Streptoverticillium grise* *ocarneum* IF0 12776、*Streptomyces lydicus* [W09606931] 等や Oomycetes [W096223 66] 等のカビなどの分泌型のトランスグルタミナーゼの遺伝子が本発明の目的に利用可能である。これらのタンパク質をコードする遺伝子は、使用する宿主に応じて、および望みの活性を得るために改変することができ、それらには 1 以上のアミノ酸の付加、欠失、置換などが含まれ、必要により宿主のコドン使用頻度に応じて最適なコドンに変換してもよい。

【0028】

天然でプレプロペプチドとして発現されるタンパク質を本発明によって分泌生産する場合は、プロ構造部（プロ部分）を含むプロタンパク質をコードする遺伝

子断片を使用することが特に好ましいが必須ではない。プロタンパク質をコードする遺伝子を使用した場合、その遺伝子の発現によって得られるタンパク質のプロ構造部は適当な手段、例えばプロテアーゼによって切断すればよく、アミノペプチダーゼ、適切な位置で切断するエンドペプチダーゼ、あるいは、より特異的なプロテアーゼを使用することができるが、その結果生じるタンパク質が天然のタンパク質と同等またはそれ以上の活性を有するような位置で切断するプロテアーゼが好ましい。あるいは、目的タンパク質または目的タンパク質のプロ構造部をコードする遺伝子配列を改変して、望みの位置に特異的なプロテアーゼの認識部位を有するタンパク質を発現するように設計することもできる。このような改変技術、遺伝子のクローニング技術、生産されたタンパク質の検出技術を含む、一般的な分子生物学的手法は当業者によく知られたものであり、例えば、Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、DNA cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)、F.M. Ausubel et al. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994)、PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich, ed., Stockton Press等を参照することができる。

【0029】

本発明により最終的に得られるタンパク質のN末端領域は必ずしも天然のタンパク質と同一でなくてもよく、1～数個のアミノ酸を余分に付加された、あるいは欠失したものであってもよい。プロテアーゼを使用する場合は、そのタンパク質の活性という観点から、一般には天然のタンパク質とほぼ同じ位置で切断されることが好ましく、天然のものと同一の成熟ペプチドであることがより好ましい。従って、一般には、天然に生じる成熟タンパク質と同一のタンパク質を生じる位置でプロペプチドを切断する特異的プロテアーゼが最も好ましい。しかしながら、特定の目的については、天然のタンパク質に比較してN末端がアミノ酸1～数個分長いあるいは短いペプチドがより適切な活性を有することがある。そのようなプロテアーゼにはDispase (ベーリンガーマンハイム社製) のような商業的

に入手できるものの他、微生物の培養液、例えば放線菌の培養液等から得られるものが含まれる。そのようなプロテアーゼは未精製状態で使用することもでき、必要に応じて適当な純度まで精製した後に使用してもよい。

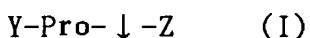
【0030】

放線菌由来のプロトランスグルタミナーゼのプロ構造部を除去するための他の好適なプロテアーゼの例としては、ストレプトマイセス・アルボグリセオラス (*Streptomyces albogriseolus*) (以後、*S. albogriseolus*と略すことがある) の產生するセリンプロテアーゼであるSAMP45がある。配列番号6および7に*S. mobaraense*のトランスグルタミナーゼの遺伝子配列とコードされる全アミノ酸配列 (1～31番目がシグナル配列、32～76番目がプロ構造部、77～407番目が成熟トランスグルタミナーゼ) を示すが、*S. mobaraense*のプロトランスグルタミナーゼの場合、SAMP45はプロ構造部中の72番目のSerと73番目のPheの間を優先的に切断するため、天然型の成熟トランスグルタミナーゼのN末端にプロ構造部のC末端のPhe-Arg-Ala-Proの4個のアミノ酸 (配列番号60) が付加された構造のタンパク質が生成される。本発明者らは、このようなタンパク質もトランスグルタミナーゼ活性を有していることを確認した。なお、SAMP45遺伝子の配列は既に決定されており、配列番号8にプロ構造の付加したタンパク質 (プロSAMP45) のアミノ酸配列を示した (J. Bacteriol., 179, 430-438(1997))。

【0031】

さらに、本発明者らが見出した、*S. mobaraense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ (svPEP) をSAMP45と組み合わせて使用することにより、N末端に付加したPhe-Arg-Ala-Proの4個のアミノ酸も除去され、天然型と同一の成熟トランスグルタミナーゼを得ることができる。

このsvPEPは、以下の式(I)で表されるペプチドまたはペプチド類似物を式中の箇所で、すなわちN末端から3番目または4番目のプロリン残基のカルボキシル側を特異的に切断する酵素である。



(式中、Yは2または3アミノ酸残基からなるオリゴペプチドであり、Zはアミノ酸、ペプチド、アミド、またはエステルである。)

【0032】

svPEPの遺伝子の塩基配列とそれにコードされる全アミノ酸配列を配列番号9および10に示す。svPEPは、*S. moharae*の培養液または*S. moharae*菌体の形態でプロテアーゼと共にプロトランスクルタミナーゼに作用させた場合に、プロ構造部を完全に切断することができ、この結果、プロ構造部が完全に除去された成熟トランスクルタミナーゼを得ることができる。あるいは、プレプロsvPEP遺伝子及びプレプロプロテアーゼ遺伝子を導入したコリネ型細菌をプロトランスクルタミナーゼを菌体外に分泌生産するコリネ型細菌と共に培養することにより、同様にプロ構造部が完全に除去された成熟トランスクルタミナーゼを得ることができる。また、プレプロトランスクルタミナーゼの遺伝子を導入したコリネ型細菌にSAMP45遺伝子とsvPEP遺伝子の両方を同様の方法で導入し、プロトランスクルタミナーゼ及びSAMP45と同時にsvPEPを菌体表層または菌体外に分泌生産させることにより、天然と同一の構造を持つ成熟トランスクルタミナーゼの生産を効率よく行うことができる。

【0033】

本発明に使用し得る遺伝子構築物のコリネ型細菌への導入方法は特に限定されず、一般に使用される方法、例えば、プロトプラスト法(Gene, 39, 281-286(1985))、エレクトロポレーション法(Bio/Technology, 7, 1067-1070)(1989))等を使用することができる。得られた遺伝子導入形質転換体は通常用いられる方法および条件に従って培養することができる。例えば、形質転換体は炭素源、窒素源、無機イオンを含有する通常の培地で培養することができる。さらに高い増殖を得るために、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を必要に応じて添加することもできる。

炭素源としてはグルコースおよびシュークロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類、その他を使用することができる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩、その他が使用できる。無機イオンとしては、カルシウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン、カリウムイオン、鉄イオン等を必要に応じて適宜使用する。培養はpH5.0～8.5、15℃～37℃の適切な範囲にて好気的条件下で行い、1～7日間程度培養する。このよう

な条件下で形質転換体を培養することにより、目的タンパク質は菌体内で多量に生産され効率よく菌体外に分泌される。トランスグルタミナーゼについては、微生物の菌体内で多量に蓄積すると一般に致死的であることが知られているが、本発明によれば生産されたトランスグルタミナーゼは菌体外に放出されるため、致死的影響を受けることなく連続的にトランスルグタミナーゼが生産される。

【0034】

本発明によって培地中に分泌されたタンパク質は、当業者によく知られた方法に従って培養後の培地から分離精製することができる。例えば、菌体を遠心分離等により除去した後、塩析、エタノール沈殿、限外濾過、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、中高圧液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等の既知の適切な方法、またはこれらを組み合わせることにより分離精製することができる。本発明によって菌体表層に分泌されたタンパク質も当業者によく知られた方法、例えば塩濃度の上昇、界面活性剤の使用等によって可溶化した後に、培地中に分泌された場合と同様にして分離精製することができる。また、ある場合には、菌体表層に分泌されたタンパク質を可溶化せずに、例えば固定化酵素として使用しても良い。

本発明は以下の実施例によって、更に具体的に説明されるが、これらはいかなる意味でも本発明を限定するものと解してはならない。

【0035】

【実施例】

実施例1：S. mobaraense IF013819由来のプレプロトランスグルタミナーゼのC. glutamicum ATCC13869における発現

(1) S. mobaraense IF013819由来トランスグルタミナーゼ遺伝子の取得

S. mobaraense DSMZ株由来トランスグルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている [Eur. J. Biochem., 257, 570-576(1998)]。この配列を参考にして、配列番号11と配列番号12に示したプライマーを合成し、常法に従って(斎藤、三浦の方法 [Biochim. Biophys. Acta, 72, 619(1963)])調製したS. mobaraense IF013819の染色体DNAから成熟トランスグルタミナーゼ配列をコードする領

域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase（宝酒造社製）を用い、反応条件は業者の推奨するプロトコルに従った。

（配列番号11）5'-GACTCCGACGACAGGGTCACCCCTCCCCGCC-3'

（配列番号12）5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTACC-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号11, 12: PCRプライマー

【0036】

次に増幅した約1.0kbのDNA断片を、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2（宝酒造社製）と [α -³²P] dCTPを用いて、添付のプロトコールに従って反応させ、DNAプローブを作製した。作製したプローブとS. moharaense IF013819の染色体DNAを用いて、Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p9. 31(1989)]に記載されているような一般的な方法に従って、サザンプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、制限酵素Sac Iで切り出される約4kbの断片にトランスグルタミナーゼ遺伝子が存在していることが確認できた。そこでS. moharaense IF013819の染色体DNAをSac Iで消化した約4kbの断片をEASY TRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲル電気泳動により回収し、これをpUC18（宝酒造社製）のSac I部位に挿入した後、Escherichia coli JM109（宝酒造社製）のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。

【0037】

先に作製したトランスグルタミナーゼのDNAプローブを用いて、Molecular Cloning 2nd edition [J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, p1.90(1989)]記載のコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリーのスクリーニングを行い、トランスグルタミナーゼ遺伝子断片がクローニングされたプラスミドを保持する菌株を取得し、これよりプラスミドを回収し、pUITGと名付けた。pUITGにクローニングされている断片の塩基配列を決定したところ、S. moharaense IF013819のトランスグルタミナーゼの遺伝子は、S. moharaense DSMZ株のトランスグルタミナーゼの遺伝子と同じ塩基配列を有することが確認された。

【0038】

塩基配列の決定の結果、このSacIの約4 k bの断片はシグナル配列（プレ部分）が一部欠けた不完全なDNA断片であることが判明した。そこでプロモーター領域と完全なシグナル配列領域のクローニングを試みた。クローニングはTAKARA LA PCR *in vitro* Cloning Kit（宝酒造社製）と配列番号13及び配列番号14に示した合成プライマーを利用し、添付のプロトコルに従って実施した。

（配列番号13）5'-GTGACCCCTGTCGTCGGAGTC-3'

（配列番号14）5'-GGCATCCTGTCGAGCGGCTC-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号13, 14 : *S. mobaraense*のプロモーター領域およびシグナル配列のためのPCRプライマー

【0039】

その結果、SalIのカセットプライマーを用いたときに約800 b pのPCR増幅断片が得られ、この断片の塩基配列を決定したところトランスグルタミナーゼ遺伝子のプロモーター領域とシグナル配列領域を含む断片であることが確認された。そこで、この約800 b pのPCR増幅断片を特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、pVITGS5を得た。さらにpUITGをSacIで消化することにより、トランスグルタミナーゼ遺伝子を含む約4 k bの断片をアガロースゲル電気泳動により回収し、この断片をpVITGS5のSacI部位に挿入し、完全長のトランスグルタミナーゼ遺伝子を含むプラスミドpVITGCを構築した。尚、塩基配列の決定はダイターミネーターサイクルシークエンシングキット（P.Eアプライドバイオシステムズ社製）とDNAシークエンサー373A（P.Eアプライドバイオシステムズ社製）を用いて行った。配列番号6にプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の配列とコードされる全アミノ酸配列を示したが、N末端の31アミノ酸配列（1～31番目）がシグナル配列（プレ部分）であり、45アミノ酸（32～76番目）がプロ構造部で、331アミノ酸（77～407番目）が成熟トランスグルタミナーゼであると考えられた。

【0040】

（2）トランスグルタミナーゼ遺伝子プロモーター領域の変換

*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子の配列は既に決定されている [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]。この配列を参考にして配列番号15と配列番号16に示したプライマーを合成し、常法に従って調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAからPS2タンパク質遺伝子のイニシエーションコンドンの5' -上流域のプロモーターを含む領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号16) 5'-GAGCTCTCCGGCGTATGCGCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号15, 16: PCRプライマー

【0041】

一方、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号12と配列番号17に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGからプレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号12) 5'-CGCTCACATCACGCCAGCCCTGCTTAC-3'

(配列番号17) 5'-ATGCCCATACGCCGGAGAGCTCTCGTCTTC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号12, 17: PCRプライマー

次に、増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子のプロモーターを含む領域と、やはり増幅させたプレプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて錫型とし、配列番号15と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーターを含む領域に接続されたプレプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、pVKPTG0を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0042】

(3) プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の*C. glutamicum* ATCC13869での発現

実施例1 (1) で構築したpVITGC (プロモーターおよびプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子のすべてが*S. moharaense*由来) あるいは、実施例1 (2) で構築したpVKPTG0 (プロモーターは*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子由来で、プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子は*S. moharaense*由来) で*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5 mg/lのクロラムフェニコールを含むCM2S寒天培地 (酵母エキストラクト 10 g、トリプトン 10 g、シュークロース 5 g、NaCl 5 g、寒天 15 g、水で1Lにする) で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVITGCあるいは、pVKPTG0を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5 mg/lのクロラムフェニコールを含むMM液体培地 (グルコース 30 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4 g、硫酸アンモニウム 30 g、リン酸二水素カリウム 1 g、硫酸鉄七水和物 0.01 g、硫酸マンガン五水和物 0.01 g、チアミン塩酸塩 200 μg、ビオチン 500 μg、DL-メチオニン 0.15 g、炭酸カルシウム 50 g、水で1LにしてpH 7.5に調整) でそれぞれ30°C、48時間培養した。培養終了後10 μlの培養上清を SDS-PAGEに供してから、Biosci.Biotechnol.Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って(例えば、J. Sambrookら(1989)(前述)に記載されるような一般的な手順)ウエスタンプロットを行った。

その結果トランスグルタミナーゼの分泌を検出することはできなかった。以上の結果より*S. moharaense*のトランスグルタミナーゼのシグナル配列は*C. glutamicum* ATCC13869においては機能しないことが確認された。

【0043】

実施例2：コリネバクテリウム・グルタミカム (*C. glutamicum* ATCC13869) の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドおよび*S. moharaense* IF013819由来の成熟トランスグルタミナーゼをコードする融合遺伝子を用いた成熟トランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有する

トランスグルタミナーゼ遺伝子の構築

*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子の配列は既に決定されている [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]。この配列を参考にして配列番号15と配列番号18に示したプライマーを合成し、実施例1(2)の方法により調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAからPS2に相当するタンパク質のN末端側アミノ酸44残基(シグナルペプチド30アミノ酸残基と成熟細胞表層タンパク質の14アミノ酸残基)をコードする領域とプロモーター領域を含む5'-上流域とをPCR法にて増幅した。また配列番号18に示したプライマーはトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、成熟トランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号18) 5'-GGGGTGACCCCTGTCGTCGGAGTCGTTGAAGCCGTTGATGTTGAA-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号15, 18; PCRプライマー

【0044】

一方、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号11と配列番号12に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGから成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

次に、増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質のN末端側アミノ酸44残基をコードする領域とプロモーター領域を含む5'-上流域とのPCR反応液1μlと、やはり増幅させた成熟トランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて铸型とし、配列番号15と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とN末端側アミノ酸44残基をコードする領域に接続された成熟トランスグルタミナーゼの融合遺伝子を増幅させた。

【0045】

アガロースゲル電気泳動により約1.7kbの増幅断片を検出した。この断片

をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、pVKTG3を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVKTG3をKpnIとXbaIを用いて消化することにより、約1.7kbのC. *glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とN末端側アミノ酸を44残基コードする領域に接続された成熟トランスクルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。この断片を特開平9-322774記載のpPK4のKpnI-XbaI部位に挿入することによって、pPKTG3を構築した。

【0046】

(2) C. *glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての成熟トランスクルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpVKTG3あるいはpPKTG3（両者ともにプロモーターとシグナルペプチドおよびN末端14アミノ酸残基からなる遺伝子はC. *glutamicum* ATCC13869由来で、成熟トランスクルタミナーゼ遺伝子はS. *moharaense*由来）を用いて、C. *glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールあるいは25mg/lのカナマイシンを含むCM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVKTG3あるいはpPKTG3を有するC. *glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールあるいは25mg/lのカナマイシンを含む上記MM液体培地で30℃、48時間培養した。培養終了後、10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci.Biotechnol.Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスクルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンプロットを行った。その結果、両菌株において培養上清に成熟トランスクルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有する、分泌されたトランスクルタミナーゼを少量検出する事ができた。

【0047】

実施例3：C. *glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナルペプチドに結合したS. *moharaense* IF013819由来のプロトランスクルタミナーゼ融合遺伝子

(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子) を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)の構築

*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子配列 [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]を参考にして、配列番号19、配列番号20、配列番号21、そして配列番号22に示したプライマーを合成した。実施例1(2)の方法により調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAから、配列番号15と配列番号19、あるいは配列番号15と配列番号20、あるいは配列番号15と配列番号21、あるいは配列番号15と配列番号22の組み合わせにより、PS2に相当するタンパク質のN末端側アミノ酸をそれぞれ30、31、44、および68残基コードする領域(シグナルペプチド30アミノ酸残基を含む)とプロモーター領域を含む5'-上流域とをPCR法にて増幅した。

【0048】

配列番号19、配列番号20、配列番号21、そして配列番号22に示したプライマーはプロ構造部付きトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロトランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号15) 5'-AAATTCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号19) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCAGCGAATGCTGGGATAGCAACGCC-3

(配列番号20) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCCTGAGCGAATGCTGGGATAGCTAC-3

(配列番号21) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCGTTGAAGCCGTTGATGTTGAA-3

(配列番号22) 5'-CTTCGTCTCTTCCCCCGCGCCATTGTCAGTCAGGTGGAGGGTTCCCTC-3

<配列表フリーテキスト>

配列番号15, 19~22: PCRプライマー

【0049】

一方、実施例1(1)で決定したトランスグルタミナーゼの遺伝子配列をもとに配列番号23と配列番号12に示したプライマーを合成し、実施例1(1)で取得したpUITGからプロトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号12) 5'-CGCTCACATCACGGCCAGCCCTGCTTAC-3'

(配列番号23) 5'-GACAATGGCGCGGGGAAGAGACGAAGTCC-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号12, 23: PCRプライマー

次に、それぞれ増幅させたC. glutamicum ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域とN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードする領域のPCR反応液各々1μlと、やはり増幅させたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号15と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、それぞれC. glutamicum ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域およびN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードするそれぞれの領域に接続されたプロトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子、すなわち、C. glutamicum ATCC13869表層タンパク質遺伝子のプロモーターに結合した異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

【0050】

アガロースゲル電気泳動により、それぞれ約1.8kbから1.9kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによって、それぞれpVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、そしてpVKPTG4を得た。前述の方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

また、pVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、そしてpVKPTG4をKpnIとXbaIを用いて消化

することにより、約1.8 kbから1.9 kbのC. glutamicum ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域とN末端側アミノ酸30、31、44、および68残基をコードするそれぞれの領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。これらの断片を特開平9-322774記載のpPK4のKpnI-XbaI部位に挿入することによって、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、そしてpPKPTG4を構築した。

【0051】

(2) C. glutamicum ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、あるいはpPKPTG4を用いてC. glutamicum ATCC13869を形質転換し、5 mg/1のクロラムフェニコールあるいは25 mg/1のカナマイシンを含む上記CM2 S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVKPTG1、pVKPTG2、pVKPTG3、pVKPTG4、pPKPTG1、pPKPTG2、pPKPTG3、あるいはpPKPTG4を有するC. glutamicum ATCC13869を、5 mg/1のクロラムフェニコールあるいは25 mg/1のカナマイシンを含む上記MM液体培地でそれぞれ30°C、48時間培養した。培養終了後10 μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci.Biotechnol. Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンプロットを行った。その結果、pVC7あるいはpPK4のどちらのベクターでも、ほぼ同量のプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌が確認されたが、PS2に相当するタンパク質の成熟タンパク質のN末端側アミノ酸残基の長さに応じて分泌量に有意な差違が認められた。代表的な分泌量を表1に示した。

【0052】

【表1】

表1. *C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

| プラスミド | プロトランスグルタミナーゼ(mg/l) |
|---------|---------------------|
| PpKPTG1 | 78 |
| PpKPTG4 | 210 |

【0053】

実施例4：コリネバクテリウム・アンモニアゲネス (*C. ammoniagenes* ATCC6872) の細胞表層タンパク質のシグナル配列、および *S. moharaense* IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. ammoniagenes* の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子（異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子）の構築

C. ammoniagenes ATCC6872の細胞表層タンパク質(SlpA)の遺伝子配列 [特開平10-108675] を参考にして配列番号24と配列番号25に示したプライマーを合成し、常法に従って調製した*C. ammoniagenes* の染色体DNAから細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域とN末端側アミノ酸25残基（シグナルペプチド）をコードする領域をPCR法にて増幅した。また配列番号25に示したプライマーはプロトランスグルタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロトランスグルタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

（配列番号24） 5' -GCCAGAACCCAAAATTGAGATT-3'

（配列番号25） 5' -CTTCGTCTCTCCCCCGCGCCATTGTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCAGC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号24, 25 : PCRプライマー

【0054】

次に、増幅させた*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域とN末端側アミノ酸25残基をコードする領域のPCR反応液1μlと、実施例3(1)で増幅させたプロ構造部付きトランスクルタミナーゼの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて錫型とし、配列番号24と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域とN末端側アミノ酸25残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスクルタミナーゼの融合遺伝子（異種融合プレプロトランスクルタミナーゼ遺伝子）を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により、約1.7kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収し、pVC7のSmaI部位に挿入することによってpVSPTG1を得た。

【0055】

(2) プロモーター領域の変換；*C. glutamicum* ATCC13869の細胞表層タンパク質遺伝子のプロモーターとの結合

*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子配列 [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]を参考にして配列番号15と配列番号26に示したプライマーを合成した。実施例1(2)の方法により調製した*C. glutamicum* ATCC13869の染色体DNAからPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域をPCR法にて増幅した。また配列番号26に示したプライマーは*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスクルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子（異種融合プレプロトランスクルタミナーゼ遺伝子）を構築するために、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列のN末端側アミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号15) 5' -AAATTCCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号26) 5' -CGCAGCCAGCGATTCATGCGTTCATAGAGGCGAAGGCTCCTTGAATAGGT-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号15、26: PCRプライマー

【0056】

一方、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子配列をもとに配列番号27と配列番号12に示したプライマーを合成し、実施例4(1)で取得したpVSPTG1から*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号12) 5'-CGCTCACATCACGCCAGCCCTGCTTACC-3'

(配列番号27) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGCTGCGGCG-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号12, 27; PCRプライマー

【0057】

次に、増幅させた*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域のPCR反応液1μlと、やはり増幅させた*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子（異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子）領域のPCR反応液1μlを混ぜて錆型とし、配列番号15と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を含む5' -上流域を有する、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸25残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により約1. 8 kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによってpVKSPTG1を得た。前述の方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0058】

また、pVKSPTG1をKpnIとXbaIを用いて消化することにより、約1. 8 kbの*C. glutamicum* ATCC13869のPS2に相当するタンパク質遺伝子のプロモーター領域を

含む5' -上流域を有する、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸25残基(シグナルペプチド)をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。この断片を特開平9-322774記載のpPK4のKpnI-XbaI部位に挿入することによって、pPKSPTG1を構築した。プラスミドpVKSPTG1およびpPKSPTG1はともに、プロモーターは*C. glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子に由来し、シグナルペプチドは*C. ammoniagenes*のSlpAに由来し、プロトランスグルタミナーゼは*S. moharae*に由来する遺伝子で構成されている。

【0059】

(3) *E.coli*のtacプロモーターへの変換

*E.coli*のtacプロモーターがクローニングされているプラスミドpKK223-3(アマシャムファルマシア社製)の配列を参考にして配列番号28と配列番号29に示したプライマーを合成した。pKK223-3のDNAからtacプロモーターに相当する領域をPCR法にて増幅した。また配列番号29に示したプライマーは*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼ遺伝子との融合遺伝子(異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子)を構築するために、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列のN末端側のアミノ酸配列をコードする配列を含んでいる。

(配列番号28) 5'-GGATCCGGAGCTTATCGACTGCACG-3'

(配列番号29) 5'-CGCAGCCAGCGATTCATGCGTTCTATAATTCTGTTCCCTGTGTGAAATTGT-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号28、29:PCRプライマー

【0060】

次に、増幅させたtacプロモーターに相当する領域のPCR反応液1μlと、実施例4(2)で増幅させた*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの遺伝子領域のP

CR反応液1μlを混ぜて鉄型とし、配列番号28と配列番号12を用いてクロスオーバーPCRを行い、tacプロモーターを有する、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸25残基をコードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子（異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子）を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により、約1.5kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収し、特開平9-070291記載のpVC7のSmaI部位に挿入することによってpVTSPTG1を得た。前述の方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0061】

また、pVTSPTG1をKpnIとXbaIを用いて消化することにより、約1.5kbのtacプロモーターを有する、*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸を25残基コードする領域に接続されたプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの融合遺伝子を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。この断片を特開平9-322774記載のpPK4のKpnI-XbaI部位に挿入することによって、pPTSPTG1を構築した。プラスミドpVTSPTG1およびpPTSPTG1はともに、*E.coli*由来のtacプロモーター、*C. ammoniagenes*のSlpAに由来するシグナルペプチド、*S. moharaense*に由来するプロトランスグルタミナーゼ遺伝子で構成されている。

【0062】

(4) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpVKSPTG1、pVTSPTG1、pPKSPTG1、pPTSPTG1を用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールあるいは25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に選択したpVKSPTG1、あるいはpVTSPTG1、pPKSPTG1、pPTSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールあるいは25mg/lのカナマイシンを含む上記MM液体培地でそれぞれ30℃にて48時間培養した。培養終了後10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、Biosci.Biotechnol.

Biochem., 58, 82-87(1994)記載の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンプロットを行った。その結果、pVC7あるいはpPK4のどちらのベクターでも、ほぼ同量のプロトランスグルタミナーゼの分泌が確認された。代表的な分泌量を表2に示した。

【0063】

【表2】

表2. *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

| プラスミド | プロトランスグルタミナーゼ(mg/l) |
|----------|---------------------|
| pPKSPTG1 | 102 |
| pPTSPTG1 | 74 |

【0064】

実施例5 : *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列、およびStreptomyces cinnamoneum IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子を用いたプロトランスグルタミナーゼの分泌生産

(1) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列、およびS. cinnamoneum IF012852由来のプロトランスグルタミナーゼをコードする配列を有する融合遺伝子の構築

S. cinnamoneum IF012852のトランスグルタミナーゼ遺伝子の配列は既に決定されている(特願平11-295649)。アミノ酸配列の1番目から32番目までがプレ部分の配列、33番目から86番目までがプロ部分の配列、87番目から416番目までが成熟型トランスグルタミナーゼの配列であると推定されている。この塩基配列とコードされる全アミノ酸配列を配列番号30および31に示す。また当該遺伝子を含むプラスミドpUJ-MTGで形質転換したEscherichia coli AJ13669は、1999年10月14日付で FERM P-17602として、通商産業省工業技術院(現、経済産業省産業技術総合研究所)生命工学工業技術研究所に寄託しており、2000年8月28日付でブダペスト条約に基づく寄託に移管され、受託番号FERM BP-7287が付与さ

れている。

まずpUJ-MTGより制限酵素BamHIでプレプロトランスクレタミナーゼ遺伝子の全長をカバーする領域約3.5Kbを切り出し、これをpUC19のBamHI部位に挿入したpUCSCTGを作製した。

【0065】

pUCSCTGを鑄型として、配列番号32と配列番号33に示したプライマーを合成し、*S. cinnamonieum* IF012852由来のプロトランスクレタミナーゼを含む遺伝子領域をこれまでと同じようにPCR法にて増幅した。

(配列番号32) 5'-GGC GAT GGG GAA GAG AAG GGG-3'

(配列番号33) 5'-GGC GGA TCC TCG CGT CGA GAG GCG TGG ACT GA-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号32, 33 : PCRプライマー

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鑄型として、配列番号34と配列番号35の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pAのシグナル配列を含む領域をPCR法にて増幅した。

【0066】

配列番号35に示したプライマーは*Streptomyces cinnamoneum* IF012852由来のプロトランスクレタミナーゼとの融合遺伝子を構築するために、*Streptomyces cinnamoneum* IF012852由来のプロトランスクレタミナーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号34) 5'-TAC GAA TTC GAG CTC GGT ACC-3'

(配列番号35) 5'-CCC CTT CTC TTC CCC ATC GCC TGC CGT TGC CAC AGG TGC GGC C-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号34, 35 : PCRプライマー

次に、増幅させた*S. cinnamonieum* IF012852由来のプロトランスクレタミナーゼを含む遺伝子をコードする領域のPCR反応液1μlと、やはり増幅させたPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質

S1pAのシグナル配列を含む領域のPCR反応液1μlを混ぜて鑄型とし、配列番号34と配列番号33を用いてクロスオーバーPCRを行い、PS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pAのシグナル配列に接続された異種融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子断片を増幅させた。

【0067】

アガロースゲル電気泳動により、約1.8kbの増幅断片を検出した。この断片をEcoRIとBamHI消化した後、アガロースゲルから回収し、pUC19のEcoRI-BamHI部位に挿入することによって、pUKSPTG2'を得た。前述した方法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。このpUKSPTG2'をEcoRIで消化した後、Blunting kit（宝酒造社製）で平滑末端化し、5'-末端がリン酸化された5'-CTCTAGAG-3'の配列を持つXbaIリンカー（宝酒造社製）を挿入し、再環状化しpUKSPTG2を構築した。pUKSPTG2をXbaIを用いて消化することにより、約1.8kbの融合プレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子（プロトランスグルタミナーゼ遺伝子は*S. cinnamomeum* IF012852由来）を切り出し、アガロースゲル電気泳動により回収した。これらの断片を前述のpPK4のXbaI部位に挿入することによって、pPKSPTG2を構築した。

【0068】

次にプロ構造部のN末端側の一部が*S. moharaense*のプロ構造部に置き替わったキメラプロ構造部を有するプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子の構築を行なった（成熟型トランスグルタミナーゼ遺伝子とプロ構造部の一部は*S. cinnamomeum* IF012852由来）。

まず実施例4(2)で構築されているプラスミドpPKSPTG1 (*S. moharaense* IF013819由来のプロトランスグルタミナーゼ発現用)より、EcoRI-BamHIの約1.8kbのプレプロトランスグルタミナーゼ遺伝子を含む断片を切り出し、pUC19のEcoRI-BamHI部位に挿入した(pUKSPTG1)。pUKSPTG1をAatII消化して約1.2kbの断片を切り出すと共に、pUKSPTG2'についてもAatII消化して約1.2kb断片を除去した約3.3kbの断片を調製した。この約3.3kbの断片とpUKSPTG1由来の約1.2kbのAatII断片とをライゲイションし、常法の遺伝子操作法に基づき、AatII断片の挿入されたク

ローンを選択した。その中でAatII断片の挿入された方向を知るために順次シーケンスを行ない、目的の方向（プレプロトランスグルタミナーゼがコードされている）に挿入されたものを選択した(pUKSPTG3')。

さらにpUKSPTG3'についても先にpUKSPTG2'で行なったと同じようにそのEcoRI部位を平滑末端化し、XbaIリンカーを挿入し、pUKSPTG3を構築した。さらにpUKSPTG3よりXbaIの約1.8kb断片を切り出し、pPK4のXbaI部位に挿入することによって、pPKSPTG3を構築した。

【0069】

(2) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いての*Streptomyces cinnamoneum* IF012852由来プロトランスグルタミナーゼの分泌

構築したプラスミドpPKSPTG2およびpPKSPTG3を用いて*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpPKSPTG2およびpPKSPTG3を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、25mg/lのカナマイシンを含むMMTG液体培地（グルコース 60g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1g、硫酸鉄七水和物 0.01g、硫酸マンガン五水和物 0.01g、チアミン塩酸塩 450μg、ビオチン 450μg、DL-メチオニン 0.15g、炭酸カルシウム 50g、水で1LにしてpH 7.5に調整）でそれぞれ30°C、3日間培養した。培養終了後10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンプロット解析を行った。本抗体は*S. moharaense*由来のトランスグルタミナーゼに対する抗体であるが、*S. cinnamoneum*由来のトランスグルタミナーゼに対しても反応性を示した。その結果、プロ構造部付き*S. cinnamoneum* IF012852由来トランスグルタミナーゼの分泌が確認された（約30～50mg/L）。

【0070】

実施例6：セリンプロテアーゼ(SAMP45)遺伝子のクローニングと発現プラスミドの作製評価

(1) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きセリンプロテアーゼ(SAMP45)遺伝子（異種融合プレプロセリンプロテアーゼ

ゼ(SAMP45)遺伝子)の構築

*S. alboriseolus*の產生するセリンプロテアーゼであるSAMP45の遺伝子の配列は既に決定されている[J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)]。この配列を参考にして配列番号36と配列番号37に示したプライマーを合成し、SAMP45のN末端プロ構造、成熟SAMP45、そしてC末端プロ構造を含む遺伝子領域を先に述べた同じ方法に従いPCR法にて増幅した。

(配列番号36) 5'-AACGGGGAGAACAGCACGGCCGCCGG-3'

(配列番号37) 5'-GGCGAATTCTCCGGCGGGCCGTACCGGT-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号36, 37: PCRプライマー

【0071】

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鑄型として、配列番号38と配列番号39の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質PS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pA遺伝子のシグナル配列を含む領域と同じくPCR法にて増幅した。

配列番号39に示したプライマーはプロ構造部付きセリンプロテアーゼとの融合遺伝子を構築するために、プロセリンプロテアーゼのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号38) 5'-GGCAAGCTAAATTCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号39) 5'-CGGCCGTGCTGTTCTCCCGTTGCCACAGGTGCGGCC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号38, 39: 融合プレプロセリンプロテアーゼ遺伝子構築のためのPCRプライマー

【0072】

次に、それぞれ増幅させたSAMP45のN末端プロ構造、成熟SAMP45、そしてC末端プロ構造を含む遺伝子をコードする領域のPCR反応液各々1μlと、やはり増幅させたPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pA遺伝子のシグナル配列を含む領域のPCR反応液1μlを混ぜて鑄型とし、配列番号38と配列番号37を用いてクロスオーバーPCRを行い、PS2

遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pAのシグナル配列に接続された異種融合プレプロセリンプロテアーゼ遺伝子断片を増幅させた。

アガロースゲル電気泳動により、約3.9kbの増幅断片を検出した。PCR産物をHindIIIとEcoRIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約3.9kbの断片をアガロースゲルから回収し、前述のpVC7のHindIII-EcoRI部位に挿入することによって、それぞれpVSS1を得た。先に述べた方法に従って挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0073】

(2) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのセリンプロテアーゼの分泌

構築したプラスミドpVSS1を用いて、*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSS1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。この培養液1mlを遠心分離により培養上清と菌体に分離した。菌体は0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁した。セリンプロテアーゼの活性測定は以下のようにして行った。0.25mMのBz-Phe-Val-Arg-pNA(バッケム社製)を含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に、培養上清あるいは菌体懸濁液50μlを加え、総液量0.6mlで30℃、20分間反応させた後、50%酢酸を0.4ml加えて反応を停止させた。410nmの吸光度を測定し、遊離したpNA(p-nitroanilide)の量を算出することにより活性を決定した。なお、酵素1単位は1分間に1μmolのpNAを遊離させる酵素量とした。その結果、培養上清にはセリンプロテアーゼの活性は検出されず、菌体懸濁液に活性を検出することができた。検出された活性値と文献[J. Bacteriol., 179, 430-438(1997)]による比活性値(1.96u/mg)から計算した結果、約9mg/l相当のセリンプロテアーゼが菌体表面に分泌発現していることが確認された。

【0074】

実施例7：プロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子のクローニングと発現プラスミド作製評価

(1) *S. moharaense* IF013819の生産するプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)の精製とN末端アミノ酸配列解析

ISP2液体培地（酵母エキストラクト 4g、マルトエキストラクト 10g、グルコース 4g、水で1LにしてpH7.3に調整）を5L坂口フラスコに800mL張り込み、*S. moharaense* IF013819株をプレートより植菌して30℃で48時間、120rpmで振盪培養した。

【0075】

培養液を遠心分離し、培養上清を除いて菌体を回収した。25mg/Lのカナマイシンを含む20mMトリス-塩酸緩衝液で洗浄後、得られた菌体を25mg/Lのカナマイシンを含む0.1M リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）に懸濁した。氷上で4時間振盪後、遠心分離により得られた上清を回収した。ニトロセルロースフィルター（ポアサイズ0.22μm、ザルトリウス社製）を用いて濾過滅菌後、FPLC (Amarsham Pharmacia社製) を用いて1.5M硫酸アンモニウム / 50mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したButyl-Sepharose 4FF (Amarsham Pharmacia社製) のカラム (1.6φ × 10cm) に通し、同緩衝液中、硫酸アンモニウム1.5-0 Mの直線濃度勾配で溶出した。活性成分を含有する画分を回収し、さらに同条件でPhenyl-Sepharose HPカラム (1mL, Amarsham Pharmacia社製) に通し、活性画分を回収し、50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）に対して一晩、4℃で透析した。これにより、部分精製酵素液を得た。部分精製酵素液を逆相クロマトグラフィーにかけてさらに純化精製した。逆相クロマトグラフィーの条件は以下の通りである。

【0076】

HPLC装置：ポンプ：HITACHI L-6300、検出器：L-4000H

カラム：PROTEIN C4 214TP5410 (VYDAC社製)

溶出条件：24-40% アセトニトリル 直線勾配 / 0.1% トリフルオロ酢酸

(20min) 室温にて溶出

流速：1.0ml / min.

検出波長：280nm

【0077】

上記条件で純化した酵素試料をメンブランカートリッジ（パーキンエルマー社

製) を用いてPolyvinylidene-difluoride(PVDF)膜に転写し、気相プロテインシーケンサーPPSQ-10(島津製作所製)にてN末端アミノ酸配列を解析した。その結果、配列番号40に示した20残基のN末端アミノ酸部分配列が得られた。

(配列番号40) Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Ile Lys Ile Pro
 1 5 10
 Gly Met Lys Phe Val Glu Glu Lys
 15 20

【0078】

(2) *S. mobaraense* IF013819由来プロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子の取得

決定したsvPEPのN末端20アミノ酸配列から推定される塩基配列中で縮重の少ない部位Lys-Ile-Pro-Gly-Met-Lys-Phe-Val-Glu-Glu-Lys(配列番号41)を選び配列番号42に示した合成オリゴヌクレオチドを作製した。この合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、常法に従って調製した*S. mobaraense* IF013819の染色体DNAを、6塩基配列を認識する種々の制限酵素で消化し、サザンプロットハイブリダイゼーション法により解析したところ、SacI切断により約6kbの単一バンドが検出された。そこで、先の方法により調製した*S. mobaraense* IF013819の染色体DNAをSacIで消化し、約6kbの断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガローズゲル電気泳動により回収した。回収断片をpUC18のSacI部位に挿入した後、*Escherichia coli* JM109(宝酒造社製)のコンピテントセルに導入し、ライブラリーを作製した。作製したライブラリーを、配列番号38に示した合成オリゴヌクレオチドの³²Pラベル化物をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより、ライブラリーのスクリーニングを行い、svPEP遺伝子断片がクローン化されたプラスミドを保持する菌株をスクリーニングし、目的とする遺伝子を取得した。この菌株より回収したプラスミドをpUMP1と名付けた。

(配列番号42) 5'-AAGATCCCCGGGATGAAGTTCGTCGAGGAGAAG-3'
 <配列表フリーテキスト>
 配列番号42: svPEP用のプローブ

pUMP1としてクローン化した断片の塩基配列を決定した。この遺伝子にコードされるアミノ酸配列を推定したところ、先に精製酵素タンパク質より決定したN末端部分アミノ酸配列（20残基）を見出し、配列番号9に示したようなsvPEPのシグナル配列およびプロ構造と想定される領域を含む全アミノ酸の一次配列を決定した。アミノ酸配列1～25番目までがシグナル配列であり、26～33番目までがプロ構造部であり、アミノ酸配列34～477番目までが成熟型svPEPと推定される。

pUMP1で形質転換したEscherichia coli AJ13691を FERM BP-7160として、2000年5月15日付けでブダペスト条約に基づき通商産業省工業技術院（現、経済産業省産業技術総合研究所）生命工学工業技術研究所に寄託してある。

【0079】

(3) *C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するプロ構造部付きプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子（異種融合プレプロプロリン特異的ペプチダーゼ(svPEP)遺伝子）の構築

実施例7(2)で決定したsvPEPの配列を参考にして、実施例7(2)で構築したpUMP1を鋳型として、配列番号43と配列番号44に示したプライマーを合成し、svPEPのプロ構造、そして成熟svPEPを含む遺伝子領域をこれまでと同じ方法でPCR法にて増幅した。

（配列番号43）5' - GAGGC GGCGT CGATCACCGCCCC-3'

（配列番号44）5' - GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCGGACCCGG-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号43, 44 : PCRプライマー

【0080】

次に、実施例4(2)で構築したpPKSPTG1を鋳型として、配列番号38と配列番号45の組み合わせにより、*C. glutamicum*の細胞表層タンパク質であるPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域と*C. ammoniagenes*の細胞表層タンパク質S1pA遺伝子のシグナル配列を含む領域をPCR法にて増幅した。

配列番号45に示したプライマーはプロ構造部付きsvPEPとの融合遺伝子を構築するために、svPEPのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号38) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号45) 5'-GGGGCGGTGATCGACGCCGCCTCTGCCGTTGCCACAGGTGCGGCCA-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号38, 45: PCRプライマー

【0081】

次に、それぞれ増幅させたsvPEPのプロ構造、そして成熟svPEPを含む遺伝子をコードする領域のPCR反応液各々1μlと、やはり増幅させたPS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とC. ammoniagenesの細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列を含む領域のPCR反応液1μlを混ぜて錫型とし、配列番号38と配列番号44を用いてクロスオーバーPCRを行い、PS2遺伝子のプロモーター領域を含む5'-上流域とC. ammoniagenesの細胞表層タンパク質SlpAのシグナル配列に接続された異種融合プレプロsvPEP遺伝子断片を増幅させた。

(配列番号38) 5'-GGCAAGCTTAAATTCCCTGTGAATTAGCTGA-3'

(配列番号44) 5'-GCCAAGCTTGAAGCACCGGCGGCCGGCACCCGG-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号38, 44: PCRプライマー

【0082】

アガロースゲル電気泳動により、約2.1kbの増幅断片を検出した。PCR産物をHindIIIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、約2.1kbの断片をアガロースゲルから回収し、実施例6(1)記載のpVSS1のHindIII部位に挿入することによって、それぞれpVSSSP1を得た。常法に従って、挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0083】

(4) C. ammoniagenesの細胞表層タンパク質のシグナル配列を用いてのプロリン特異的ペプチダーゼの分泌

構築したプラスミドpVSSSP1を用いて、C. glutamicum ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSSSP1を有するC. glutamicum ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールを含む上記MMTG液体培地で30℃、70時間培養した。この培養

液1mlを遠心分離により培養上清と菌体に分離した。菌体は0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に懸濁した。svPEPの活性測定は以下のようにして行った。0.25mMのAla-Ala-Pro-pNA(バッケム社製)を含有する20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に、培養上清あるいは菌体懸濁液50μlを加え、総液量0.6mlで30°C、20分間反応させた後、50%酢酸を0.4ml加えて反応を停止させた。410nmの吸光度を測定し、遊離したpNAの量を算出することにより活性を決定した。なお、酵素1単位は1分間に1μmolのpNAを遊離させる酵素量とした。その結果、培養上清にはsvPEPの活性は検出されず、菌体懸濁液に活性を検出することができた。検出された活性値と実施例7(1)による比活性値(35.5u/mg)から計算した結果、約50mg/l相当のsvPEPが菌体表面に分泌発現していることが確認された。

【0084】

(5) *C. glutamicum* ATCC13869において分泌発現されたセリンプロテアーゼとプロリン特異的ペプチダーゼによるプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部の切断

構築したプラスミドpVSSSP1を用いて、実施例4(2)に記載したプロ構造部付きトランスグルタミナーゼの分泌発現プラスミドpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を形質転換し、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で生育した菌株を選択した。次に、選択したpVSSSP1及びpPKSPTG1を有する*C. glutamicum* ATCC13869を、5mg/lのクロラムフェニコールと25mg/lのカナマイシンを含む上記MMTG液体培地で30°C、70時間培養した。培養終了後10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、前述の抗トランスグルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従って、ウエスタンプロット解析を行った。その結果SAMP45およびsvPEPが正常に分泌発現し、やはり分泌されているプロ構造部付きトランスグルタミナーゼのプロ構造部が切断され、天然型の成熟トランスグルタミナーゼとほぼ同じ分子量を有するトランスグルタミナーゼの分泌が認められた。

【0085】

この培養上清について前述のハイドロキサメート法にてトランスグルタミナーゼ活性を確認したところ、天然型とほぼ同じ比活性(約20U/mg)を有する事が確

認できた。

また、SDS-PAGE後、前述の方法に従って、PVDF膜にセミドライプロッティングした。プロッティング後、PVDF膜をクマシーブリリアントブルーで染色し、脱染、風乾した。成熟トランスグルタミナーゼの部分を取り、プロテインシークエンサーでN末端アミノ酸配列の解析を行った。その結果、配列番号6に示したS.mobaraense由来の77番目のAspから始まる天然型の成熟トランスグルタミナーゼと同一のN末端を有する配列を取っていることが確認された。

【0086】

実施例8：Corynebacterium ammoniagenesATCC6872の細胞表層タンパク質のシグナル配列、およびヒト上皮細胞増殖因子(hEGF)をコードする配列を有する融合遺伝子を用いたヒト上皮細胞増殖因子の分泌生産

(1) Corynebacterium glutamicumATCC13869の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するhEGF遺伝子の構築

Corynebacterium glutamicumの細胞表層タンパク質であるPS2の遺伝子の配列は既に決定されている [Mol. Microbiol., 9, 97-109(1993)]。この配列を参考にして配列番号46と配列番号47に示したプライマーを合成し、斎藤、三浦の方法 [Biochem. Biophys. Act., 72, 619(1963)]により調製したCorynebacterium glutamicumATCC13869の染色体DNAからPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を44残基コードする領域をPCR法にて増幅した。配列番号46に示したプライマーは5'端側にプラスミドへ挿入するために必要な制限酵素KpnIの認識配列を含んでいる。

(配列番号46) 5'-GCTCGGTACCCAAATTCCCTGTGAATTAGCTGATTTAG-3'

(配列番号47) 5'-GTTGAAGCCGTTGTTGATGTTGAA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号46, 47: PCRプライマー

【0087】

一方、配列番号48と配列番号49に示したプライマーを合成し、hEGF遺伝子の配列を含んでいるプラスミドpT13S△hIL2-KS-hEGF(H3)（特開昭64-2583）からhEGFをコードする領域をPCR法にて増幅した。また当該遺伝子を含むプラスミ

ド pT13S Δ hIL2-KS-hEGF(H3)を形質転換したEscherichia coli AJ12354をFERM P-9719として、工業技術院（現、経済産業省産業技術総合研究所）生命工学工業技術研究所に寄託してある。

配列番号48に示したプライマーはPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を44残基コードする領域との融合遺伝子を構築するためにPS2のシグナル配列C末端側のアミノ酸をコードする遺伝子配列を含んでいる。

（配列番号48）5'-AACATCAACAAACGGCTTCAACAATTCCGATTCTGAGTGCCCT-3'

（配列番号49）5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号48, 49: PCRプライマー

【0088】

次に、増幅させたCorynebacterium glutamicumのPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を44残基コードする領域のPCR反応液1μlと、やはり増幅させたhEGFの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて錆型とし、配列番号46と配列番号49を用いてクロスオーバーPCRを行い、Corynebacterium glutamicumの細胞表層タンパク質の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を44残基コードする領域に接続されたhEGFの融合遺伝子を増幅させた。アガロースゲル電気泳動により約0.9kbの増幅断片を検出した。この断片をEASY TRAP Ver.2（宝酒造社製）を用いてアガロースゲルから回収した。回収したDNAを制限酵素KpnIとBamHI（宝酒造社製）により切断し、DNA Clean-UP system(Promega社製)により精製し、特開平9-322774記載のプラスミドpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、pPKEGFを得た。ダイターミネーターサイクルシークエンシングキット（PEアプライドバイオシステムズ社製）とDNAシークエンサー377A（PEアプライドバイオシステムズ社製）を用いて挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0089】

（2）Corynebacterium ammoniagenesATCC6872の細胞表層タンパク質のシグナル配列を有するhEGF遺伝子の構築

Corynebacterium ammoniagenesATCC6872の細胞表層タンパク質(SlpA)の配列 [

特開平10-108675]を参考にして配列番号24と配列番号50に示したプライマーを合成し、実施例8(1)記載の方法により調製したCorynebacterium ammoniagenesの染色体DNAから細胞表層タンパク質(SlpA)の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を25残基コードする領域をPCR法にて増幅した。また配列番号50に示したプライマーはhEGFとの融合遺伝子を構築するために、hEGFのN末端側のアミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号24) 5'-GCCAGAAGCCAAAATTGAGATTT-3'

(配列番号50) 5'-AGGGCACTCAGAATCGGAATTGCCGTTGCCACAGGTGCAGGCC-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列24, 50: PCRプライマー

【0090】

一方、配列番号51と配列番号49に示したプライマーを合成し、hEGF遺伝子の配列を含んでいるプラスミドpT13S△hIL2-KS-hEGF(H3)（特開昭64-2583）からhEGFをコードする領域をPCR法にて増幅した。

(配列番号49) 5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

(配列番号51) 5'-AATTCCGATTCTGAGTGCCCT-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号49, 51: PCRプライマー

【0091】

次に、増幅させたCorynebacterium ammoniagenesの細胞表層タンパク質(SlpA)の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を25残基コードする領域のPCR反応液1μlと、hEGF遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて鑄型とし、配列番号49と配列番号24を用いてクロスオーバーPCRを行い、Corynebacterium ammoniagenesの細胞表層タンパク質(SlpA)の5'ー上流域とN末端側アミノ酸を25残基コードする領域に接続されたhEGFの融合遺伝子を増幅させた。

さらに、配列番号52と配列番号53に示したプライマーを合成し、実施例8(1)により作製したプラスミドpPEGFを鑄型としてPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域をPCR法にて増幅した。また配列番号53に示したプライマーはPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域の3'側の配列とCorynebacterium ammoni

agenesの細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列N末端側アミノ酸をコードする配列を含んでいる。

(配列番号52) 5'-GAATTCGAGCTCGGTACCCA-3'

(配列番号53) 5'-AGCGATTCATGCGTTCATAGAGGCGAAGGCCCTTGAA-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号52、53:PCRプライマー

【0092】

一方、先にPCRで増幅した*Corynebacterium ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)の5'ー上流域を含むシグナル配列を有するhEGF遺伝子との融合遺伝子の配列をもとに、配列番号54と配列番号49に示したプライマーにより、*Corynebacterium ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するhEGFの遺伝子領域をPCR法にて増幅した。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用いており、反応条件はこのプロトコールに従った。

(配列番号49) 5'-CGGCCACGATGCGTCCGGCG-3'

(配列番号54) 5'-ATGAAACGCATGAAATCGCTGGC-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号49、54:PCRプライマー

【0093】

次に、増幅させた*Corynebacterium glutamicum*のPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域のPCR反応液1μlと、やはり増幅させた*Corynebacterium ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のシグナル配列を有するhEGFの遺伝子領域のPCR反応液1μlを混ぜて鋳型とし、配列番号52と配列番号49を用いてクロスオーバーPCRを行い、*Corynebacterium glutamicum*のPS2に相当するタンパク質の5'ー上流域と、*Corynebacterium ammoniagenes*の細胞表層タンパク質(SlpA)のN末端側アミノ酸を25残基コードする領域に接続されたhEGFの融合遺伝子を増幅させた。PCR反応にはPyrobest DNA polymerase(宝酒造社製)を用いており、反応条件はこのプロトコールに従った。アガロースゲル電気泳動により約0.9kbの増幅断片を検出した。この断片をEASYTRAP Ver.2(宝酒造社製)を用いてアガロースゲルから回収し、制限酵素KpnIとBamHI(宝酒造社製)により切断し、DNA

Clean-UP system(promega社製)により精製した。これを特開平9-322774記載のプラスミドpPK4のKpnI-BamHI部位に挿入することによって、pPSEGfを得た。ダイターミネーターサイクルシークエンシングキット(PEアプライドバイオシステムズ社製)とDNAシークエンサー377A(PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて挿入断片の塩基配列の決定を行い、予想通りの融合遺伝子が構築されていることを確認した。

【0094】

(3) hEGF生産株の作製

(2) で作製したhEGF発現プラスミドpPSEGfを用いてCorynebacterium glutamicum ATCC13869をエレクトロポレーション法により形質転換し、カナマイシン耐性株を取得した。得られた株を25mg/1のカナマイシンを含むMMTG液体培地(グルコース 60g、硫酸マグネシウム七水和物 0.4g、硫酸アンモニウム 30g、リン酸二水素カリウム 1g、硫酸鉄七水和物 0.01g、硫酸マンガン五水和物 0.01g、チアミン塩酸塩 450μg、ビオチン 450μg、DL-メチオニン 0.15g、炭酸カルシウム 50g、水で1LにしてpH7.5に調整)でそれぞれ30°C、3日間振とう培養した。菌体を遠心除去した培養上清10μlをSDS-PAGEに供した。市販hEGF(PEPRO TECHEC LTD)を標準品として同時に泳動し、クマシーブリリアントブルー(CBB)染色を行った結果、同移動度の位置にバンドを検出した。培養上清中に他の不純タンパク質はほとんど検出されなかった。

【0095】

(4) プラスミドpPSEGfを有するhEGF生産株のhEGF生産量の測定

hEGF生産株の培養上清をHPLCカラム(YMC-AP203Ca300A.C18,粒径5μm,径4.6mm×長さ250mm)、バッファー0.1%TFA/24%アセトニトリル, 0.1%TFA/4%アセトニトリル、1%/minリニアグラジエント、流速1.0ml/min、検出280nmで分析しhEGFの標準品を分析した時のピーク面積との比較により定量を行った結果、およそ100mg/Lであった。

【0096】

(5) プラスミドpPSEGfを有するhEGF生産株により分泌されたhEGFの生物活性

測定

hEGF生産株の培養上清中EGF活性を測定した。MCF-7細胞 (A.V.Krishman, *Journal of Bone and research*, 6, 1099-1107, 1991) を96穴プレートに1穴あたり初発細胞数 1×10^4 個まき、EGF生産株の培養上清の2倍希釈液を添加した。72時間培養後のチミジンの取りこみ量を測定した。市販のhEGF標準品 (フナコシ) 10^7 U/mgと比較し活性値を算出した結果、 1.4×10^9 U/mlであった。

【0097】

(6) プラスミドpPSEGF を有するhEGF生産株により分泌されたhEGFのN末端アミノ酸配列の解析

hEGF生産株の培養上清 $120 \mu l$ をHPLCカラムにかけ、HPLCによる定量に記載した条件で分離した。そして、hEGF標準品の溶出位置と一致するピークを分取した。このサンプルをN末端アミノ酸解析に供した。測定は気相アミノ酸シーケンサー PPSQ-10 (島津製作所) を用いた。測定結果は、N末端より1残基目Asn、2残基目Ser、3残基目Asp、4残基目Serであった。この結果は、配列番号55に記載したhEGFのアミノ酸配列のN末端配列と一致した。

【0098】

(7) プラスミドpPSEGF を有するhEGF生産株により分泌されたhEGFの分子量測定

hEGF生産株の培養上清 $120 \mu l$ をHPLCカラムにかけ、HPLCによる定量に実(4)に記載した条件で分離した。

そして、溶出されたhEGFのピークを分取した。このサンプルをさらに再度、同HPLCにより分取を行ない、HPLCにおいて1ピークであることを確認した。このサンプルを分子量分析に供した。測定は、MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計) MALDI IV (島津製作所) を用いて行った。2回の測定値の平均は6176であり、この結果は、hEGFの分子量、すなわち分子内に3つのS-S結合が存在するとして計算された理論値6217と誤差範囲内であった。従って、上記記載の方法で作製されたEGF生産株の分泌しているhEGFが予想されたアミノ酸配列と構造を有していることが確認された。

【0099】

実施例9：異種タンパク質分泌能の向上したコリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036およびAJ12036より細胞表層タンパク質（PS2）遺伝子破壊株の作製とこれらの変異株を用いる異種タンパク質の分泌生産評価

- (1) コリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036より細胞表層タンパク質（PS2）遺伝子破壊株の作製

Corynebacterium glutamicum ATCC13869より既にストレプトマイシン(Sm)耐性株AJ12036が育種されており、*Corynebacterium glutamicum*での遺伝子組換え用の一つの宿主として使用されている（米国特許第4,822,738号）。*Corynebacterium glutamicum*（旧名称*Brevibacterium lactofermentum*）AJ12036はFERM BP-734として、工業技術院（現、経済産業省産業技術総合研究所）生命工学工業技術研究所に寄託してある。

AJ12036株は細胞表層タンパク質(PS2)を少量、培地中に分泌していることが確認されたので、完全にPS2を生成しないように遺伝子破壊を行なえばタンパク質の分泌効率をさらに向上させることができるのでないかと考えられる。そこで以下のようにPS2遺伝子完全欠損株の造成を相同組換え法を用いて行なった。

【0100】

斎藤、三浦の方法 [Biochim. Biophys. Acta., 72, 619(1963)] により調製した*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869の染色体DNAから、下記に示したプライマーを合成し、配列番号56と57、配列番号58と59の組み合わせでPCRを行なった。*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869のPS2遺伝子配列は米国特許第5,547,864号に記載されており、またコーディング領域の一部およびその5'上流域の遺伝子配列は配列番号4に示されている。

次に増幅したそれぞれの断片と配列番号56と59のプライマーの組み合わせでCrossover-PCRを行ない、PS2遺伝子のプロモーター領域およびコーディング領域のN末端側を欠損させた△PS2断片を増幅させた。この断片をpUC19のSmaI部位にクローン化し、pU△PS2を構築した。pU△PS2をKpnIとXbaI消化して△PS2断片を切り出し、プラスミドpHM1519由来の温度感受性プラスミドベクターであるpHS4（米国特許第5,616,480号）のKpnI-XbaI部位に挿入することにより、pHS△PS2を構築した。プラスミドpHS4で形質転換された*Escherichia coli* AJ12570はFER

M BP-3523として、工業技術院（現、経済産業省産業技術総合研究所）生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0101】

（配列番号56） 5'-act ggg agg cta tct cca tt-3'

（配列番号57） 5'-atc gat ctg atc acg tta ca-3'

（配列番号58） 5'-tgt aac gtg atc aga tcg att cac tgg tcg aca ccg ttg a-3'

（配列番号59） 5'-acg gaa gct acc ttc gag gt-3'

＜配列表フリーテキスト＞

配列番号56～59：PCRプライマー

次にpHSΔPS2をAJ12036株にエレクトロポレーションにより導入し、日本特許登録2763054に記載した相同組換え法によりPS2遺伝子完全欠損株を取得した。本株をYDK010株と命名した。

【0102】

（2）コリネバクテリウム・グルタミカムAJ12036およびAJ12036よりの細胞表層タンパク質（PS2）遺伝子破壊株を用いる異種タンパク質の分泌生産評価

AJ12036株とYDK010株にプロトランスグルタミナーゼ分泌発現プラスミドである実施例4(2)のpPKSPTG1を導入し、形質転換体を得た。これらの形質転換体とpPKSPTG1を野生株Corynebacterium glutamicum ATCC13869に導入したものを対照として、分泌生産量について比較評価した。

同様にSAMP45分泌発現プラスミドpVSS1、svPEP分泌発現プラスミドpVSSSP1、および、hEGF分泌発現プラスミドpPSEGFIについてもそれぞれAJ12036株とYDK010株の形質転換体を得て、分泌生産量を評価した。

2.5mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で30℃で一晩生育した菌株をMMTG培地(Glucose 60g/L, MgSO₄·7H₂O 1g/L, MnSO₄·4H₂O 1g/L, FeSO₄·7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 30g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L, VB1·HC1 450μg/L, Biotin 450μg/L, DL-Met 0.15g/L, pH7.5)にCaCO₃ 5%およびカナマイシン25μg/mlを添加した培地の4mlを張り込んだ大型試験管に接種し、30℃、3日間行なった。

【0103】

【表3】

表3 変異株におけるプロトランスグルタミナーゼの分泌生産量

| 生産株 | プロトランスグルタミナーゼ |
|------------------------|---------------|
| ATCC13869/pPKSPTG1 | 235 mg/L |
| AJ12036/pPKSPTG1 | 680 |
| <u>YDK010/pPKSPTG1</u> | 700 |

【0104】

【表4】

表4 変異株におけるSAMP45の分泌生産量

| 生産株 | SAMP45 |
|---------------------|--------|
| ATCC13869/pVSS1 | 9 mg/L |
| AJ12036/pVSS1 | 20 |
| <u>YDK010/pVSS1</u> | 22 |

【0105】

【表5】

表5 変異株におけるsvPEPの分泌生産量

| 生産株 | svPEP |
|-----------------------|---------|
| ATCC13869/PvsssP1 | 50 mg/L |
| AJ12036/pVSSSP1 | 130 |
| <u>YDK010/pVSSSP1</u> | 150 |

【0106】

【表6】

表6 変異株におけるhEGFの分泌生産量

| 生産株 | hEGF |
|------------------|----------|
| ATCC13869/pPSEGF | 100 mg/L |
| AJ12036/pPSEGF | 280 |
| YDK010/pPSEGF | 290 |

【0107】

その結果、表3～6に示したように宿主を野生株よりストレプトマイシン耐性株AJ12036に変更することにより大幅なプロトランスグルタミナーゼ、SAMP45、svPEPおよびhEGFの分泌生産量の改善が認められた。しかしAJ12036株から細胞表層タンパク質(PS2)遺伝子を完全欠損することによる分泌生産量の向上効果はわずかに認められたに過ぎなかった。PS2の分泌によるプロトランスグルタミナーゼおよびhEGFの分泌への拮抗によるマイナス効果はこの場合には顕著には認められなかった。ただし、PS2遺伝子完全欠損株ではPS2の分泌が全く認められないことより、培地中の不要夾雜タンパク質の低減化には寄与しており、プロトランスグルタミナーゼおよびhEGFの精製過程でのメリットがある。

【0108】

実施例10：プロトランスグルタミナーゼ分泌に対する培養有効因子

先のpPKSPTG1でCorynebacterium glutamicum YDK010株を形質転換した組換え体を用いて、プロトランスグルタミナーゼの分泌生産における培養条件検討を行なった。

25mg/lのカナマイシンを含む上記CM2S寒天培地で30℃で一晩生育した菌株をCM2S液体培地の20mlを含む500ml容の坂口フラスコに接種し、30℃で一晩培養した。これをシードとして用いた。

メイン培養として、25mg/lのカナマイシンを含むMMTG液体培地(Glucose 60g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1g/L, MnSO₄ · 4H₂O 1g/L, FeSO₄ · 7H₂O 1g/L, (NH₄)₂SO₄ 30g/L, KH₂PO₄ 1.5g/L, VB1 · HCl 450μg/L, Biotin 450μg/L, DL-Met 0.15g/L, pH7.

5)を基本培地としてS型ジャー培養にてCaCl₂の添加効果を検討した。培地の300mlを張り込み、シード量は5%(15ml)とし、溶存酸素濃度3%以下に抑制して、30℃、3日間培養を行なった。

培養終了後10μlの培養上清をSDS-PAGEに供してから、上記記載の抗トランスクルタミナーゼ抗体を用いて、常法に従ってウエスタンブロット解析を行った。その結果、表7に示すようにCaCl₂を添加した培養区は無添加の区に比し、約1.3倍～2倍の分泌量を示し、カルシウムの添加効果が認められた。

【0109】

【表7】

表7 プロトランスクルタミナーゼの分泌生産培養におけるカルシウムイオンの効果

| CaCl ₂ (g/L) | プロトランスクルタミナーゼ蓄積(mg/L) | 相対比 |
|-------------------------|-----------------------|-----|
| 0 | 460 | 1 |
| 0.25 | 610 | 1.3 |
| 0.5 | 790 | 1.7 |
| 1.0 | 810 | 1.8 |
| 2.0 | 930 | 2.0 |

【0110】

さらに上記MMTG培地にCaCl₂の2.0g/Lを含む培地を用いて、通気攪拌条件を検討した結果、培地中の溶存酸素濃度を測定限界である3%以下に抑制することの方が良好との結果を得た(表8)。

【0111】

【表8】

表8 プロトランスグルタミナーゼの分泌生産培養における溶存酸素濃度の効果

| 溶存酸素濃度 | プロトランスグルタミナーゼ蓄積(mg/L) | 相対比 |
|--------|-----------------------|------|
| 3%以下 | 930 | 1.43 |
| 3%制御 | 810 | 1.25 |
| 5%制御 | 650 | 1 |

【0112】

本発明により、コリネバクテリウム属細菌に有用タンパク質、例えばトランスグルタミナーゼやヒト上皮細胞成長因子等の異種タンパク質を多量に産生させ、かつ効率よく菌体外に分泌させることができる。本発明によって生産されるタンパク質は培地中に放出されるため、既知の適切な方法により、簡便かつ大規模に培地から直接回収することができる。

【0113】

【発明の効果】

本発明により、コリネ型細菌に産業上有用な異種タンパク質、例えばトランスグルタミナーゼやヒト上皮細胞成長因子を生産させ、これを効率的に菌体外に放出（分泌生産）させることによって、異種タンパク質を製造する方法が提供される。

【0114】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> A method of secreting and producing proteins

<130> Y1I0204

<140>

<141>

<160> 60

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> **Corynebacterium glutamicum**

<400> 1

Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys Ala Gln Ala Lys

1

5

10

15

Arg Arg Ser Leu Trp Ile Ala Ala Gly Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala

20

25

30

Leu Thr Met Ser Leu Ala Pro Met Ala Ser Ala

35

40

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> **Corynebacterium glutamicum**

<400> 2

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala

20

25

30

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> **Corynebacterium ammoniagenes**

<400> 3

Met Lys Arg Met Lys Ser Leu Ala Ala Ala Leu Thr Val Ala Gly Ala

1

5

10

15

Met Leu Ala Ala Pro Val Ala Thr Ala

20

25

<210> 4

<211> 782

<212> DNA

<213> **Corynebacterium glutamicum**

<220>

<221> CDS

<222> (579)..(782)

<400> 4

aaattcctgt gaatttagctg atttagtact tttcggaggt gtctattctt accaaatcgt 60

caagttgtgg gtagagtcac ctgaatatta attgcaccgc acgggtgata tatgcttatt 120

tgctcaagta gttcgagggtt aagtgtattt taggtgaaca aatttcagct tcgggtagaa 180

gactttcgat gcgcttcaga gcttctattt ggaaatctga caccacttga ttAAatagcc 240

taccccccga ttgggggatt ggtcatttt tgctgtgaag gtagtttga tgcataatgac 300

ctgcgttat aaagaaatgt aaacgtgatc agatcgatataaaagaaaca gtttgtactc 360

aggttgaag cattttctcc gattcgcctg gcaaaaatct caattgtcgc ttacagtttt 420

tctcaacgac aggctgctaa gctgctagtt cggtggccta gtgagtggcg ttactttgga 480

taaaagtaat cccatgtcgt gatcagccat ttgggttgtt ccatacgatca atccaaagg 540

ttcgtcttc gatacctatt caaggagcct tcgcctct atg ttt aac aac cgt atc 596

Met Phe Asn Asn Arg Ile

1

5

cgc act gca gct ctc gct ggt gca atc gca atc tcc acc gca gct tcc 644

Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser

10

15

20

ggc gta gct atc cca gca ttc gct cag gag acc aac cca acc ttc aac 692

Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu Thr Asn Pro Thr Phe Asn

25

30

35

atc aac aac ggc ttc aac gat gct gat gga tcc acc atc cag cca gtt 740

Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr Ile Gln Pro Val

40

45

50

gag cca gtt aac cac acc gag gaa acc ctc cgc gac ctg act 782

Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu Arg Asp Leu Thr

55

60

65

<210> 5

<211> 68

<212> PRT

<213> **Corynebacterium glutamicum**

<400> 5

Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile Ala

1

5

10

15

Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val Ala Ile Pro Ala Phe Ala Gln Glu

20

25

30

Thr Asn Pro Thr Phe Asn Ile Asn Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly

35

40

45

Ser Thr Ile Gln Pro Val Glu Pro Val Asn His Thr Glu Glu Thr Leu

50

55

60

Arg Asp Leu Thr

65

<210> 6

<211> 1809

<212> DNA

<213> **Streptoverticillium moharaense**

<220>

<221> CDS

<222> (578)..(1798)

<400> 6

gtcgacgcgg gccgggaggg ggtgcggcgg cgccttcgg ctgtgtggac gaagcgtcgg 60

gtcggaggggg cggccggata tcgtccttgg ggcggggtgg ccggaattgc cgccatggtg 120

ttgccgggga atcgacccga agacatgatc acttctcgta tccacccgat cacgtatccg 180

ggagtcgaga agtgttacgc cgtccccctg tccgcgtcct caccctgtc gccgtgacag 240

cgacccgcgt tcttccactc gcacggacgg ccccacagga cctttcggcc cgggctcgcc 300

ccggccgcctc ggtgacggcc tccgaataac gcggccgcgg gggcctcggc cggttgaccg 360

atccgggtca cgcgccccgc cgggcggcgg gccacgtccg gtctcggccc gcccgacatc 420

ggctgcgact gcctcgctc gcacttcttc ccgcctcccg gccgcgttt tccgcccgg 480

aagggtgcggc gacgcgtacc gaatccccct tcatcgac gtgcttccgc acggccgcgt 540

tcaacgatgt tccacgacaa aggagttgca ggtttcc atg cgc ata cgc cgg aga 595

Met Arg Ile Arg Arg Arg

1 5

gct ctc gtc ttc gcc act atg agt gcg gtg tta tgc acc gcc gga ttc 643

Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val Leu Cys Thr Ala Gly Phe

10 15 20

atg ccg tcg gcc ggc gag gcc gcc gac aat ggc gcg ggg gaa gag 691

Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu

25 30 35

acg aag tcc tac gcc gaa acc tac cgc ctc acg gcg gat gac gtc gcg 739

Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala

40 45 50

aac atc aac gcg ctc aac gaa agc gct ccg gcc gct tcg agc gcc ggc 787

Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly

55 60 65 70

ccg tcg ttc cgg gcc ccc gac tcc gac gac agg gtc acc cct ccc gcc 835

Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala

75 80 85

| | | | |
|---|------|-----|-----|
| gag ccg ctc gac agg atg ccc gac ccg tac cgt ccc tcg tac ggc agg | 883 | | |
| Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg | | | |
| 90 | 95 | 100 | |
| | | | |
| gcc gag acg gtc gtc aac aac tac ata cgc aag tgg cag cag gtc tac | 931 | | |
| Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr | | | |
| 105 | 110 | 115 | |
| | | | |
| agc cac cgc gac ggc agg aag cag cag atg acc gag gag cag cgg gag | 979 | | |
| Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu | | | |
| 120 | 125 | 130 | |
| | | | |
| tgg ctg tcc tac ggc tgc gtc ggt gtc acc tgg gtc aat tcg ggt cag | 1027 | | |
| Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln | | | |
| 135 | 140 | 145 | 150 |
| | | | |
| tac ccg acg aac aga ctg gcc ttc gcg tcc ttc gac gag gac agg ttc | 1075 | | |
| Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe | | | |
| 155 | 160 | 165 | |
| | | | |
| aag aac gag ctg aag aac ggc agg ccc cgg tcc ggc gag acg cgg gcg | 1123 | | |
| Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala | | | |
| 170 | 175 | 180 | |
| | | | |
| gag ttc gag ggc cgc gtc gcg aag gag agc ttc gac gag gag aag ggc | 1171 | | |
| Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly | | | |
| 185 | 190 | 195 | |
| | | | |
| ttc cag cgg gcg cgt gag gtg gcg tcc gtc atg aac agg gcc ctg gag | 1219 | | |
| | | | |

Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu

200 205 210

aac gcc cac gac gag agc gct tac ctc gac aac ctc aag aag gaa ctg 1267

Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu

215 220 225 230

gcg aac ggc aac gac gcc ctg cgc aac gag gac gcc cgt tcc ccg ttc 1315

Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe

235 240 245

tac tcg gcg ctg cgg aac acg ccg tcc ttc aag gag cgg aac gga ggc 1363

Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly

250 255 260

aat cac gac ccg tcc agg atg aag gcc gtc atc tac tcg aag cac ttc 1411

Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe

265 270 275

tgg agc ggc cag gac cgg tcg agt tcg gcc gac aag agg aag tac ggc 1459

Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly

280 285 290

gac ccg gac gcc ttc cgc ccc gcc ccg ggc acc ggc ctg gtc gac atg 1507

Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met

295 300 305 310

tcg agg gac agg aac att ccg cgc agc ccc acc agc ccc ggt gag gga 1555

Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly

315

320

325

ttc gtc aat ttc gac tac ggc tgg ttc ggc gcc cag acg gaa gcg gac 1603

Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp

330

335

340

gcc gac aag acc gtc tgg acc cac gga aat cac tat cac gcg ccc aat 1651

Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn

345

350

355

ggc agc ctg ggt gcc atg cat gtc tac gag agc aag ttc cgc aac tgg 1699

Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp

360

365

370

tcc gag ggt tac tcg gac ttc gac cgc gga gcc tat gtg atc acc ttc 1747

Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe

375

380

385

390

atc ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc gac aag gta aag cag ggc tgg 1795

Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp

395

400

405

ccg tcatgtgagc g 1809

Pro

<210> 7

<211> 407

<212> PRT

<213> **Streptoverticillium moharaense**

<400> 7

Met Arg Ile Arg Arg Arg Ala Leu Val Phe Ala Thr Met Ser Ala Val

1 5 10 15

Leu Cys Thr Ala Gly Phe Met Pro Ser Ala Gly Glu Ala Ala Ala Asp

20 25 30

Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg Leu

35 40 45

Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro Asp Ser Asp Asp

65 70 75 80

Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Asp Pro Tyr

85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg

100 105 110

Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg Lys Gln Gln Met

115 120 125

Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr

130 135 140

Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser
 145 150 155 160

Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn Gly Arg Pro Arg
 165 170 175

Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val Ala Lys Glu Ser
 180 185 190

Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu Val Ala Ser Val
 195 200 205

Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser Ala Tyr Leu Asp
 210 215 220

Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala Leu Arg Asn Glu
 225 230 235 240

Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe
 245 250 255

Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg Met Lys Ala Val
 260 265 270

Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg Ser Ser Ser Ala
 275 280 285

Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg Pro Ala Pro Gly

290

295

300

Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile Pro Arg Ser Pro

305

310

315

320

Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly

325

330

335

Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp Thr His Gly Asn

340

345

350

His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met His Val Tyr Glu

355

360

365

Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp Phe Asp Arg Gly

370

375

380

Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Asp

385

390

395

400

Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro

405

<210> 8

<211> 1079

<212> PRT

<213> Streptomyces albogriseolus

<400> 8

Asn Gly Glu Asn Ser Thr Ala Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ala Thr Ala

1

5

10

15

Leu Lys Gly Lys His Arg Val Thr Leu Ile Thr Gly Asp Arg Val Ala

20

25

30

Leu Asp Ala Lys Gly Arg Val Val Gly Leu Glu Pro Ala Glu Gly Arg

35

40

45

Glu His Ile Pro Val Gln Ile Arg Arg Ser Asp Gly His Thr Leu Val

50

55

60

Val Pro Ala Asp Ala Ala Arg Leu Val Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gln

65

70

75

80

Arg Leu Phe Asp Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Ala Thr Arg Thr Ala

85

90

95

His Arg Gly Gly Leu Lys Val Ile Val Gly Tyr Arg Gly Ala Ala Lys

100

105

110

Ala Ala Lys Ala Asp Val Arg Asp Ala Gly Thr Val Arg Arg Thr Leu

115

120

125

Thr Ser Leu Asn Ala Asp Ala Val Gln Thr Pro Gln Glu Ala Gly Ala

130

135

140

Glu Leu Trp Glu Ala Val Thr Asp Gly Asp Arg Thr Ala Ser Gly Val
 145 150 155 160

Ala Arg Val Trp Leu Asp Gly Val Arg Lys Ala Ser Leu Asp Thr Ser
 165 170 175

Val Gly Gln Ile Gly Thr Pro Lys Ala Trp Glu Ala Gly Tyr Asp Gly
 180 185 190

Lys Gly Val Lys Ile Ala Val Leu Asp Thr Gly Val Asp Ala Thr His
 195 200 205

Pro Asp Leu Lys Gly Gln Val Thr Ala Ser Lys Asn Phe Thr Ser Ala
 210 215 220

Pro Thr Thr Gly Asp Val Val Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile
 225 230 235 240

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gln Ser Lys Gly Thr Tyr Lys Gly Val Ala
 245 250 255

Pro Gly Ala Lys Ile Leu Asn Gly Lys Val Leu Asp Asp Ala Gly Phe
 260 265 270

Gly Asp Asp Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Glu Trp Ala Ala Gln
 275 280 285

Gly Ala Asp Ile Val Asn Met Ser Leu Gly Gly Met Asp Thr Pro Glu
 290 295 300

Thr Asp Pro Leu Glu Ala Ala Val Asp Lys Leu Ser Ala Glu Lys Gly
 305 310 315 320

Ile Leu Phe Ala Ile Ala Ala Gly Asn Glu Gly Pro Gln Ser Ile Gly
 325 330 335

Ser Pro Gly Ser Ala Asp Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Val Asp Asp
 340 345 350

Lys Asp Lys Leu Ala Asp Phe Ser Ser Thr Gly Pro Arg Leu Gly Asp
 355 360 365

Gly Ala Val Lys Pro Asp Leu Thr Ala Pro Gly Val Asp Ile Thr Ala
 370 375 380

Ala Ser Ala Lys Gly Asn Asp Ile Ala Lys Glu Val Gly Glu Lys Pro
 385 390 395 400

Ala Gly Tyr Met Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val
 405 410 415

Ala Gly Ala Ala Ala Leu Leu Lys Gln Gln His Pro Glu Trp Lys Tyr
 420 425 430

Ala Glu Leu Lys Gly Ala Leu Thr Ala Ser Thr Lys Asp Gly Lys Tyr
 435 440 445

Thr Pro Phe Glu Gln Gly Ser Gly Arg Val Gln Val Asp Lys Ala Ile

450

455

460

Thr Gln Thr Val Ile Ala Glu Pro Val Ser Leu Ser Phe Gly Val Gln

465

470

475

480

Gln Trp Pro His Ala Asp Asp Lys Pro Val Thr Lys Lys Leu Thr Tyr

485

490

495

Arg Asn Leu Gly Thr Glu Asp Val Thr Leu Lys Leu Thr Ser Thr Ala

500

505

510

Thr Gly Pro Lys Gly Lys Ala Ala Pro Ala Gly Phe Phe Thr Leu Gly

515

520

525

Ala Ser Thr Leu Thr Val Pro Ala Asn Gly Thr Ala Ser Val Asp Val

530

535

540

Thr Ala Asp Thr Arg Leu Gly Gly Ala Val Asp Gly Thr Tyr Ser Ala

545

550

555

560

Tyr Val Val Ala Thr Gly Ala Gly Gln Ser Val Arg Thr Ala Ala Ala

565

570

575

Val Glu Arg Glu Val Glu Ser Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val Leu Asp

580

585

590

Arg Ser Gly Lys Ala Thr Ala Asn Tyr Met Ala Tyr Leu Ser Gly Leu

595

600

605

Thr Gly Leu Gly Lys Asp Arg Ser Tyr Ala Pro Tyr Glu Ala Asp Gly

610 615 620

Ala Val Ser Val Arg Val Pro Lys Gly Gly Tyr Val Leu Asp Ala Ser

625 630 635 640

Val Leu Val Gly Ala Asp Pro Glu Thr Trp Arg Gly Ala Asp Trp Leu

645 650 655

Ala Gln Pro Lys Leu Asp Val Thr Arg Asn Thr Thr Val Thr Val Asp

660 665 670

Ala Arg Lys Ala Lys Pro Val Lys Val Thr Val Pro Gly Lys Ala Ala

675 680 685

Lys Ala Gln Phe Ala Ser Ala Asp Tyr Thr Ile Glu Thr Asn Asp Ser

690 695 700

Ala Val Ser Tyr Gly Trp Trp Leu Glu Asn Tyr Ser Gly Phe Arg Ser

705 710 715 720

Ala His Leu Gly Pro Gln Ile Thr Asn Gly Thr Leu Ser Gln Gln Trp

725 730 735

Asn Thr His Phe Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gln Tyr Thr Ala Ile Ser

740 745 750

Gly Gly Lys Val Lys Lys Leu Ala Thr Gly Tyr Thr Arg Ala Phe Lys

755 760 765

Ala Lys Glu Phe Ala Thr Val Gln Val Gly Met Gly Ala Ala Ala Ser

770 775 780

Gly Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala Phe Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser

785 790 795 800

Gly Ala Ser Gly Phe Ser Gln Glu Gln Lys Leu Pro Ser Thr Arg Thr

805 810 815

Leu Tyr Leu Ser Thr Val Asn Gly Val Thr Trp Asp Leu Asp Phe Glu

820 825 830

Gln Leu Gly Gly Val Asp Asn Glu Gly Trp Pro Ile Tyr Asp Ala Val

835 840 845

Tyr Thr Ile Gly Val Gly Lys Thr Tyr Lys Gly Gly Lys Thr Tyr Lys

850 855 860

Glu Thr Val Asn Thr Ala Val Phe Gly Pro Arg Leu Thr Ser Ser Tyr

865 870 875 880

Gly Val Phe Arg Asp Gly Asn Ser Ile Tyr Gly Val Ile Pro Leu Phe

885 890 895

Ala Asp Gly Lys Gly His Ala Gly Ser Ser Glu Phe Ser Ser Ala Val

900 905 910

Thr Thr Leu Tyr Arg Asn Gly Lys Lys Val Gly Ser Asn Asn Asp Pro

915

920

925

Leu Phe Gly Glu Glu Gly Phe Thr Val Pro Ser Gly Asp Ala Ala Tyr

930

935

940

Arg Leu Thr Thr Ser Val Lys Arg Ser Ala Lys Val Ala Ala Ala Ser

945

950

955

960

Thr Arg Ile Asp Ala Ser Trp Thr Phe Arg Ser Lys Lys Thr Ser Gly

965

970

975

Glu Lys Gln Leu Pro Val Ser Ser Ala Arg Phe Ala Ala Val Thr Gly

980

985

990

Leu Asp Ser Lys Val Ala Ala Gly Lys Lys Ala Thr Phe Pro Val Val

995

1000

1005

Val Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Asn Leu Lys Ser Leu Ala Val Tyr

1010

1015

1020

Val Ser Tyr Asn Gly Gly Lys Thr Trp Lys Lys Thr Thr Val Thr Lys

1025

1030

1035

1040

Gly Lys Ile Thr Val Lys Asn Pro Ala Lys Gly Lys Ala Ile Ser Phe

1045

1050

1055

Arg Ala Lys Ile Thr Asp Lys Lys Gly Asn Ala Ser Leu Ile Thr Ile

1060

1065

1070

His Asn Ala Tyr Tyr Gly Lys

1075

<210> 9

<211> 1751

<212> DNA

<213> **Streptoverticillium moharaense**

<220>

<221> CDS

<222> (229)..(1659)

<400> 9

gctcctatga gcatcgacgc cgccagcagc gatcggttcg gtctgaccgt cgacgcccac 60

ggcgagcgcg tgtggctgga cgagcccggt cggcccggtgc cgctcggtgc gccgtgaaag 120

gccccaaaag agcccaagcc gtgtgaactg cgaggacaaa gggtctggcg caacgcatgt 180

caccccgat aagttcgccg cgaccttgc gaacccaggg gagggcgc atg cgc aag 237

Met Arg Lys

1

gct ctc aga tcg ctg ctg gcg gcg tcg atg ctc ata gga gcg atc ggc 285

Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly Ala Ile Gly

5

10

15

gcc ggc agc gcc acg gcg gag gcg gcg tcg atc acc gcc ccg cag gcc 333

Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala Pro Gln Ala

20

25

30

35

gac atc aag gac cgc atc ctg aag att ccc ggg atg aag ttc gtc gag 381

Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu

40

45

50

gag aag ccc tac cag ggc tac cgc tac ctc gtg atg acg tac cgg cag 429

Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr Tyr Arg Gln

55

60

65

ccg gtg gac cac cgc aat ccc ggc aag ggg acc ttc gag cag cgc ttc 477

Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu Gln Arg Phe

70

75

80

acc ctg ctc cac aag gac acc gac cgg ccg acc gtg ttc ttc acg tcc 525

Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Thr Ser

85

90

95

ggc tac aac gtc tcc acc aac ccc agc cgc agc gag ccc acg cgc atc 573

Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro Thr Arg Ile

100 105 110 115

gtg gac ggc aac cag gtg tcg atg gag tac cgg ttc ttc acg ccg tcc 621

Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe Thr Pro Ser

120

125

130

cgg ccg cag ccc gcc gac tgg tcc aag ctg gac atc tgg cag gcg gcg 669

Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp Gln Ala Ala

135

140

145

agt gac cag cac cgc ctg tac cag gcg ctg aag ccg gtc tac ggg aag 717

Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val Tyr Gly Lys

150

155

160

aac tgg ctg gcc acg ggc ggc agc aag ggc ggc atg acg gcc acc tac 765

Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr Ala Thr Tyr

165

170

175

ttc cgc cgc ttc tac ccg aac gac atg aac ggc acg gtc gcc tac gtc 813

Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val Ala Tyr Val

180 185 190 195

gcg ccc aac gac gtg aac gac aag gaa gac tcg gcg tac gac aag ttc 861

Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr Asp Lys Phe

200

205

210

ttc cag aac gtc ggc gac aag gcg tgc cgc acg cag ctc aac tcg gtg 909

Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu Asn Ser Val

215

220

225

cag cgc gag gcg ctc gtc cgc cgc gac gag atc gtc gcc cgc tac gag 957

Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala Arg Tyr Glu

230

235

240

aag tgg gct aag gag aac ggc aag acg ttc aag gtc gtc ggc agc gcc 1005

Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val Gly Ser Ala

245

250

255

gac aag gcg tac gag aac gtc gtc ctc gac ctg gtc tgg tcc ttc tgg 1053
 Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp Ser Phe Trp
 260 265 270 275

cag tac cac ctg cag agc gac tgc gcc tcc gtc ccc gcc acc aag gcg 1101
 Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala Thr Lys Ala
 280 285 290

tcc acc gac gag ctg tac aag ttc atc gac gac atc tcg ggc ttc gac 1149
 Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser Gly Phe Asp
 295 300 305

ggc tac acc gac cag ggc ctg gag cgc ttc acc ccg tac tac tac cag 1197
 Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr Tyr Gln
 310 315 320

gcg ggc acc cag ctc ggc gcc cct acg gtg aag aac ccg cac ctc aag 1245
 Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro His Leu Lys
 325 330 335

ggc gtg ctg cgg tac ccc ggc atc aac cag ccg cgc tcg tac gtc ccc 1293
 Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser Tyr Val Pro
 340 345 350 355

cgc gac atc ccg atg acc ttc cgc ccc ggc gcg atg gcg gac gtc gac 1341
 Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala Asp Val Asp
 360 365 370

cgc tgg gtg cgc gag gac agc cgg aac atg ctc ttc gtg tac ggg cag 1389
 Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val Tyr Gly Gln
 375 380 385

aac gac ccg tgg agc ggt gaa ccg ttc cgc ctg ggc aag ggc gcc gcc 1437
 Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys Gly Ala Ala
 390 395 400

gcc cgg cac gac tac cgc ttc tac gcc ccg ggc ggc aac cac ggt tcc 1485
 Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn His Gly Ser
 405 410 415

aac atc gcc cag ttg gtg gcc gac gag cgg gcc aag gcc acg gcc gag 1533
 Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala Thr Ala Glu
 420 425 430 435

gtc ctg aag tgg gcc ggt gtg gcg ccg cag gcc gtc cag aag gac gag 1581
 Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln Lys Asp Glu
 440 445 450

aag gcc gcc aag ccg ctc gcg ccg ttc gac gcc aag ctc gac cgc gtg 1629
 Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu Asp Arg Val
 455 460 465

aag aac gac aag cag agc gcg ctg cgt ccg tagggaccca gtgcgttaagg 1679
 Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro
 470 475

cggcgggcgc tcccgcgag gggcgccgc cgtcgcttc cgaaaggccc cgggtgccc 1739

cgccggcgtc

1751

<210> 10

<211> 477

<212> PRT

<213> **Streptoverticillium moharaense**

<400> 10

Met Arg Lys Ala Leu Arg Ser Leu Leu Ala Ala Ser Met Leu Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ile Gly Ala Gly Ser Ala Thr Ala Glu Ala Ala Ser Ile Thr Ala
 20 25 30

Pro Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys
 35 40 45

Phe Val Glu Glu Lys Pro Tyr Gln Gly Tyr Arg Tyr Leu Val Met Thr
 50 55 60

Tyr Arg Gln Pro Val Asp His Arg Asn Pro Gly Lys Gly Thr Phe Glu
 65 70 75 80

Gln Arg Phe Thr Leu Leu His Lys Asp Thr Asp Arg Pro Thr Val Phe
 85 90 95

Phe Thr Ser Gly Tyr Asn Val Ser Thr Asn Pro Ser Arg Ser Glu Pro

100

105

110

Thr Arg Ile Val Asp Gly Asn Gln Val Ser Met Glu Tyr Arg Phe Phe

115

120

125

Thr Pro Ser Arg Pro Gln Pro Ala Asp Trp Ser Lys Leu Asp Ile Trp

130

135

140

Gln Ala Ala Ser Asp Gln His Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Lys Pro Val

145

150

155

160

Tyr Gly Lys Asn Trp Leu Ala Thr Gly Gly Ser Lys Gly Gly Met Thr

165

170

175

Ala Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Tyr Pro Asn Asp Met Asn Gly Thr Val

180

185

190

Ala Tyr Val Ala Pro Asn Asp Val Asn Asp Lys Glu Asp Ser Ala Tyr

195

200

205

Asp Lys Phe Phe Gln Asn Val Gly Asp Lys Ala Cys Arg Thr Gln Leu

210

215

220

Asn Ser Val Gln Arg Glu Ala Leu Val Arg Arg Asp Glu Ile Val Ala

225

230

235

240

Arg Tyr Glu Lys Trp Ala Lys Glu Asn Gly Lys Thr Phe Lys Val Val

245

250

255

Gly Ser Ala Asp Lys Ala Tyr Glu Asn Val Val Leu Asp Leu Val Trp

260

265

270

Ser Phe Trp Gln Tyr His Leu Gln Ser Asp Cys Ala Ser Val Pro Ala

275

280

285

Thr Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Tyr Lys Phe Ile Asp Asp Ile Ser

290

295

300

Gly Phe Asp Gly Tyr Thr Asp Gln Gly Leu Glu Arg Phe Thr Pro Tyr

305

310

315

320

Tyr Tyr Gln Ala Gly Thr Gln Leu Gly Ala Pro Thr Val Lys Asn Pro

325

330

335

His Leu Lys Gly Val Leu Arg Tyr Pro Gly Ile Asn Gln Pro Arg Ser

340

345

350

Tyr Val Pro Arg Asp Ile Pro Met Thr Phe Arg Pro Gly Ala Met Ala

355

360

365

Asp Val Asp Arg Trp Val Arg Glu Asp Ser Arg Asn Met Leu Phe Val

370

375

380

Tyr Gly Gln Asn Asp Pro Trp Ser Gly Glu Pro Phe Arg Leu Gly Lys

385

390

395

400

Gly Ala Ala Ala Arg His Asp Tyr Arg Phe Tyr Ala Pro Gly Gly Asn

405

410

415

His Gly Ser Asn Ile Ala Gln Leu Val Ala Asp Glu Arg Ala Lys Ala

420

425

430

Thr Ala Glu Val Leu Lys Trp Ala Gly Val Ala Pro Gln Ala Val Gln

435

440

445

Lys Asp Glu Lys Ala Ala Lys Pro Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys Leu

450

455

460

Asp Arg Val Lys Asn Asp Lys Gln Ser Ala Leu Arg Pro

465

470

475

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11

gactccgacg acagggtcac ccctccggcc

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 12

cgctcacatc acggccagcc ctgctttacc

30

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the promoter region and signal sequence region of
S.mobaraense

<400> 13

gtgaccctgt cgtcgaggatc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
the promoter region and signal sequence region of
S.mobaraense

<400> 14

ggcatcctgt cgagcggctc

20

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15

aaattcctgt gaatttagctg atttag

26

<210> 16

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

gagctctccg gcgtatgcgc atagaggcga aggctccttg aata

44

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

atgcgcatac gccggagagc tctcggtttc

30

<210> 18

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 18

ggggtgaccc tgtcgtcgga gtcgttgaag ccgttgttga ttttggaa

47

<210> 19

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 19

ttcgtctct tccccgcgc cattgtcagc gaatgctggg atagcaacgc c 51

<210> 20

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 20

ttcgtctct tccccgcgc cattgtccctg agcgaatgct gggatagcta c 51

<210> 21

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 21

cttcgtctct tcccccgcbc cattgtcggtt gaagccgttg ttgatgttga a

51

<210> 22

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 22

cttcgtctct tcccccgcbc cattgtcagt caggtcgcgg agggtttcct c

51

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 23

gacaatggcgc cgggggaaga gacgaagtcc

30

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 24

gccccagaagc ccaaaattga gattt

25

<210> 25

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 25

cttcgtctct tccccgcgc cattgtctgc cgttgccaca ggtgcggcca gc

52

<210> 26

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 26

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataga ggcgaaggct ccttgaatag gt 52

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 27

atgaaacgca tgaaatcgct ggctgcggcg 30

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 28

ggatccggag cttatcgact gcacg

25

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 29

cgcagccagc gatttcatgc gtttcataat tctgtttcct gtgtgaaatt gt

52

<210> 30

<211> 1461

<212> DNA

<213> **Streptoverticillium cinnamoneum**

<220>

<221> CDS

<222> (151)..(1398)

<400> 30

cggcggcagc cctccttgcc gccggcgca gacgcagga cggcgccggcc aaggccctga 60

gcggcagctc gtcgcaaacc cctccatcg ctcgtgtct cacatgccct cgttcacga 120

ggcttcacca caagggagtt attgatttcc atg cac aaa cgt cgg aga ctt ctc 174
 Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu
 1 5

gcc ttc gcc act gtg ggt gcg gtc ata tgc acc gca gga ttc aca cct 222
 Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro
 10 15 20

tcg gtc agc cag gcc gcc agc agt ggc gat ggg gaa gag aag ggg tcc 270
 Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser
 25 30 35 40

tac gcc gaa acg cac ggc ctg acg gcg gat gac gtc gag agc atc aac 318
 Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn
 45 50 55

gca ctg aac gaa aga gct ctg act ctg ggc caa cct ggc aag cct ccg 366
 Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 60 65 70

aag gaa tta cct ccg agc gcc agc gcg ccc tcc cgg gcc ccc tcc gat 414
 Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp
 75 80 85

gac cgg gaa act cct ccc gcc gag ccg ctc gac agg atg cct gag gcg 462
 Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala
 90 95 100

tac cgg gcc tac gga ggc agg gcc act acg gtc gtc aac aac tac ata 510

Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile

105

110

115

120

cgc aag tgg cag cag gtc tac agt cac cgc gac gga aag aaa cag caa 558

Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln

125

130

135

atg acc gaa gag cag cga gaa aag ctg tcc tac ggt tgc gtt ggc gtc 606

Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val

140

145

150

acc tgg gtc aac tcg ggc ccc tac ccg acg aac aga ttg gcg ttc gcg 654

Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala

155

160

165

tcc ttc gac gag aac aag tac aag aac gac ctg aag aac acc agc ccc 702

Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro

170

175

180

cga ccc gat gaa acg cgg gcg gag ttc gag ggt cgc atc gcc aag ggc 750

Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly

185

190

195

200

agt ttc gac gag ggg aag ggt ttc aag cgg gcg cgt gat gtg gcg tcc 798

Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser

205

210

215

gtc atg aac aag gcc ctg gaa aat gcc cac gac gag ggg act tac atc 846

Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile

220

225

230

aac aac ctc aag acg gag ctc acg aac aac aat gac gct ctg ctc cgc 894

Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg

235

240

245

gag gac agc cgc tcg aac ttc tac tcg gcg ctg agg aac aca ccg tcc 942

Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser

250

255

260

ttc aag gaa agg gac ggc ggc aac tac gac ccg tcc aag atg aag gcg 990

Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala

265

270

275

280

gtg atc tac tcg aag cac ttc tgg agc ggg cag gac cag cgg ggc tcc 1038

Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser

285

290

295

tcc gac aag agg aag tac ggc gac ccg gaa gcc ttc cgc ccc gac cag 1086

Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln

300

305

310

ggt acc ggc ctg gtc gac atg tcg aag gac aga agc att ccg cgc agt 1134

Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser

315

320

325

ccg gcc aag ccc ggc gaa ggt tgg gtc aat ttc gac tac ggt tgg ttc 1182

Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe

330

335

340

ggg gct caa aca gaa gcg gat gcc gac aaa acc aca tgg acc cac ggc 1230

Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly

345 350 355 360

gac cac tac cac gcg ccc aat agc gac ctg ggc ccc atg cac gta cac 1278

Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser Asp Leu Gly Pro Met His Val His

365 370 375

gag agc aag ttc cgg aag tgg tct gcc ggg tac gcg gac ttc gac cgc 1326

Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg

380 385 390

gga gcc tac gtg atc acg ttc ata ccc aag agc tgg aac acc gcc ccc 1374

Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro

395 400 405

gcc aag gtg gag caa ggc tgg ccg tgacaggctg gtactacgac ctctgctgat 1428

Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro

410 415

ttctgccccgg tcagtccacg cctctcgacg cga 1461

<210> 31

<211> 416

<212> PRT

<213> **Streptoverticillium cinnamoneum**

<400> 31

Met His Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ala Phe Ala Thr Val Gly Ala Val

1

5

10

15

Ile Cys Thr Ala Gly Phe Thr Pro Ser Val Ser Gln Ala Ala Ser Ser

20

25

30

Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr

35

40

45

Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr

50

55

60

Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser

65

70

75

80

Ala Pro Ser Arg Ala Pro Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu

85

90

95

Pro Leu Asp Arg Met Pro Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala

100

105

110

Thr Thr Val Val Asn Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser

115

120

125

His Arg Asp Gly Lys Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys

130

135

140

Leu Ser Tyr Gly Cys Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr

145

150

155

160

Pro Thr Asn Arg Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys

165

170

175

Asn Asp Leu Lys Asn Thr Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu

180

185

190

Phe Glu Gly Arg Ile Ala Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe

195

200

205

Lys Arg Ala Arg Asp Val Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn

210

215

220

Ala His Asp Glu Gly Thr Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr

225

230

235

240

Asn Asn Asn Asp Ala Leu Leu Arg Glu Asp Ser Arg Ser Asn Phe Tyr

245

250

255

Ser Ala Leu Arg Asn Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asp Gly Gly Asn

260

265

270

Tyr Asp Pro Ser Lys Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp

275

280

285

Ser Gly Gln Asp Gln Arg Gly Ser Ser Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp

290

295

300

Pro Glu Ala Phe Arg Pro Asp Gln Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser
 305 310 315 320

Lys Asp Arg Ser Ile Pro Arg Ser Pro Ala Lys Pro Gly Glu Gly Trp
 325 330 335

Val Asn Phe Asp Tyr Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala
 340 345 350

Asp Lys Thr Thr Trp Thr His Gly Asp His Tyr His Ala Pro Asn Ser
 355 360 365

Asp Leu Gly Pro Met His Val His Glu Ser Lys Phe Arg Lys Trp Ser
 370 375 380

Ala Gly Tyr Ala Asp Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile
 385 390 395 400

Pro Lys Ser Trp Asn Thr Ala Pro Ala Lys Val Glu Gln Gly Trp Pro
 405 410 415

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 32

ggcgatgggg aagagaaggg g

21

<210> 33

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 33

ggcggatcct cgcgtcgaga ggcgtggact ga

32

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 34

tacgaattcg agctcggtac c

21

<210> 35

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 35

cccccttctct tccccatcgc ctgccgttgc cacaggtgcg gcc

43

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 36

aacggggaga acagcacggc cgccgg

26

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 37

ggcgaattct ccggcgggcc gtcaccgg

29

<210> 38

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
fused prepro-serineprotease construction

<400> 38

ggcaagctta aattcctgtg aattagctga

30

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer for
fused prepro-serineprotease gene construction

<400> 39

cgccccgtgct gttctcccg tttgccgttg ccacaggtgc ggcc

44

<210> 40

<211> 20

<212> .PRT

<213> **Streptoverticillium moharaence**

<400> 40

Gln Ala Asp Ile Lys Asp Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe

1

5

10

15

Val Glu Glu Lys

20

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> **Artificial Sequence**

<220>

<223> **Description of Artificial Sequence: probe for svPEP**

<400> 41

Lys Ile Pro Gly Met Lys Phe Val Glu Glu Lys

1

5

10

101

出証特2003-3023815

<210> 42

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:probe for svPEP

<400> 42

aagatcccg ggatgaagtt cgtcgaggag aag

33

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 43

gaggcggcgt cgatcaccgc ccc

23

<210> 44

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 44

gccaaagcttg aagcaccggc ggcggcaccc gg 32

<210> 45

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 45

ggggcggta tcgacgcccgc ctctgccgtt gccacaggtg cggcca 46

<210> 46

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 46

gctcggtacc caaattcctg tgaattagct gatttag

37

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 47

gttgaagccg ttgttgatgt tgaa

24

<210> 48

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 48

aacatcaaca acggcttcaa caattccgat tctgagtgcc ct

42

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 49

cggccacgat gcgtccggcg

20

<210> 50

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 50

aggcactca gaatcggaat ttgccgttgc cacaggtgct gcc

43

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 51

aattccgatt ctgagtgccc t

21

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 52

gaattcgagc tcggtaccca

20

<210> 53

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 53

agcgatttca tgcgttcat agagggcgaag gctcccttgaa

40

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 54

atgaaacgca tgaaatcgct ggc

23

<210> 55

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His

1

5

10

15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn

20

25

30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys

35

40

45

Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 56

actgggaggc tatctccatt

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 57

atcgatctga tcacgttaca

20

<210> 58

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 58

tgtaacgtga tcagatcgat tcactggtcg acaccgttga

40

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 59

acggaagcta cttcgaggt

20

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> **Streptoverticillium moharaense**

<400> 60

Phe Arg Ala Pro

特2001-098808

1

110

出証特2003-3023815

出願人履歴情報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社



Creation date: 02-03-2004

Indexing Officer: AKIDANE1 - AZIEB KIDANE

Team: OIPEBackFileIndexing

Dossier: 10632283 ✓

Legal Date: 12-29-2003 ✓

| No. | Doccode | Number of pages |
|-----|---------|-----------------|
| 1 | PEFR | 4 |
| 2 | OATH | 3 |

Total number of pages: 7

Remarks:

Order of re-scan issued on